



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis de variación intraespecífica en el veneno de la
serpiente de coral del Balsas (*Micrurus laticollaris*)**

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

OMAR GIBRAN RODRÍGUEZ BARRERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MELISA BÉNARD VALLE

Junio de 2024



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Financiamiento del proyecto

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM), bajo la tutoría de la Dra. Melisa Bénard Valle.

Agradezco el apoyo económico al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca para alimentación y hospedaje.

Así como al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por el apoyo económico otorgado con el proyecto FORDECYT-CONAHCYT 303045 (Venenos y antivenenos).

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Melisa Bénard Valle, porque no me alcanzan las gracias por tanto apoyo, paciencia y pláticas frikis con café. Todo mi cariño, admiración y respeto hasta que Zoro deje de perderse.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, por la oportunidad de aprender tanto en su grupo y por mostrarme que uno puede apasionarse por muchos temas a la par.

A la Micrurusbandita, Melisa, Cris y Manuel, por las pláticas raras, el apoyo y las caminatas montañosas donde nunca encontrábamos serpientes, pero eran buen pretexto para tomar aire.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 13, algunos noctámbulos empedernidos, Alid, Victor, Andrei, Andrid (Jr), Germán y el viajero Gilberto; otros más diurnos, Mike, Iván, Hilda, Sam, Edgar, Herlinda, Sofía, Vanesa, Alejandro, Felipe, Fátima, Mitzi, Angélica y al Dr. Corzo.

Al Dr. Edgar Neri por su apoyo con las pruebas de neutralización y ELISA.

A la Dra. Hilda por sus comentarios oportunos que ayudaron a cimentar mejor este trabajo (y claro, también por comprarme muchos quesos).

A la Sra. Manuela, cuya labor (y amabilidad) facilita a mares nuestro proceder diario.

Gracias en demasía por los partidos de fútbol, el chismecito con café, las pláticas ñoñas sobre serpientes, venenos y locuras, pero, antes y después, gracias a todos por ser parte de este pedacito eterno de mi vida.

Finalmente (quizá, primeramente), me gustaría agradecer a mis padres: Adelaida Barrera Sandoval y Abraham Rodríguez Contreras por todo su apoyo a lo largo de estos años, por confiar en que algún día iba a concluir esta tesis y escucharme cuando les hablaba de ella, aunque me miraban como un loquito. Con toda mi admiración y cariño por siempre y para siempre.

A mi familia: Melisa, Camila y Gerardo. Porque no saben cuánto me han animado de una u otra forma para seguir aquí.

A Fernanda Calderón, porque has estado conmigo en este camino enrevesado sin criticarme, escuchándome y apoyándome con tus chistes espontáneos, que más de una vez me han dado la energía que el café no da.

ÍNDICE

I.	Lista de abreviaturas usadas.....	VI
II.	Lista de figuras.....	VII
III.	Lista de tablas.....	IX
IV.	Resumen.....	X
1.	Introducción	1
1.1.	Las serpientes	1
1.2.	Serpientes de coral	2
1.3.	Características de <i>Micrurus laticollaris</i>	3
1.4.	Epidemiología	5
1.5.	Composición del veneno.....	5
1.6.	Toxinas de tres dedos	6
1.7.	Fosfolipasas A ₂	8
1.8.	Antivenenos	9
2.	Antecedentes	11
2.1.	Variación intraespecífica en venenos de serpientes de coral	11
2.2.	Neutralización de venenos de serpientes de coral.....	14
2.3.	Estudios previos del veneno de <i>Micrurus laticollaris</i>	16
3.	Hipótesis	20
4.	Objetivos.....	20
4.1.	Objetivo general.....	20
4.2.	Objetivos específicos	20
5.	Materiales y Métodos	21
5.1.	Veneno	21
5.2.	Cuantificación de proteínas	23
5.2.1.	Absorbancia 280 nm.....	23
5.2.2.	Método del ácido bicinónico	23
5.3.	Geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE)	23
5.4.	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).....	24

5.5. Determinación de masa molecular por ESI/MS.....	25
5.6. Actividad fosfolipasa	25
5.7. ELISA.....	26
5.8. Letalidades	26
5.9. Neutralización con antiveneno	27
5.9.1. Coralmy [®] lote B-2H-12.....	27
5.9.2. Coralmy [®] lote B-0E-33	28
6. Resultados.....	28
6.1. Primera parte: Variación individual del veneno de <i>Micrurus laticollaris</i>	28
6.1.1. Geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE).....	28
6.1.2. Porcentaje de abundancia de las fracciones.....	29
6.1.3. Actividad enzimática de tipo PLA ₂	35
6.2. Segunda parte: letalidad y neutralización de las mezclas por Estado y las fracciones purificadas.....	36
6.2.1. Purificación e identificación de fracciones por Estado	36
6.2.2. Actividad enzimática de las fracciones purificadas de las mezclas por estado.....	39
6.2.3. Análisis de letalidad.....	40
6.2.4. Reconocimiento y neutralización con Coralmy [®]	44
7. Discusión.....	49
7.1. Variación intraespecífica.....	49
7.2. Reconocimiento y neutralización con Coralmy [®]	52
7.3. Envenenamiento en humanos.....	60
8. Conclusiones	64
9. Referencias	66
10. ANEXOS.....	77
10.1. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico (BCA)	77
10.2. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).....	78
10.3. Ensayo titulométrico de actividad PLA ₂	79
10.4. Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	80

I. LISTA DE ABREVIATURAS USADAS

3FTxs	Toxinas de tres dedos.
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nanómetros.
ACh	Acetilcolina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
BCA	Ácido bicinconínico.
Birmex	Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CRiSPs	Proteínas secretadas ricas en cisteína.
DE ₅₀	Dosis Efectiva Media.
DL ₅₀	Dosis Letal Media.
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas.
Fab	Dominio de unión a antígeno.
F(ab)' ₂	Fragmento de inmunoglobulina compuesto por dos Fab.
GBIF	Global Biodiversity Information Facility.
IgGs	Inmunoglobulinas G.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
i.v.	Vía intravenosa.
KDa	Kilodalton.
LAAOs	L-aminoácido oxidasas.
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina.
PBS	Buffer fosfato salino.
pH	Potencial de hidrógeno.
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂ .
RP-HPLC	Cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución.
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio.
SVMP	Metaloproteasas de veneno de serpiente.

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Cabeza de una serpiente elápidica mostrando a detalle la glándula de veneno y patrón de coloración de algunas especies de coralillos mexicanas.....	2
Figura 2 Individuos de <i>M. laticollaris laticollaris</i> del Herpetario Cantil y mapa de distribución de <i>Micrurus laticollaris</i> con las dos subespecies conocidas.....	4
Figura 3 Distribución de <i>M. mipartitus</i> en Colombia y de <i>M. multifasciatus</i> en Costa Rica y composición del veneno de <i>M. mipartitus</i> y de <i>M. multifasciatus</i>	12
Figura 4 Comparación de perfiles del veneno, obtenidos mediante RP-HPLC de <i>M. mipartitus</i> de Colombia y dos individuos de <i>M. multifasciatus</i> de Costa Rica.....	13
Figura 5 Alteraciones tisulares generadas por la administración endovenosa de veneno de <i>M. laticollaris</i>	17
Figura 6 Efectos del veneno de <i>M. browni</i> y <i>M. laticollaris</i> en riñones perfundidos.....	18
Figura 7 Bloqueo neuromuscular causado por el veneno de <i>M. laticollaris</i> en preparaciones de músculo “biventer cervisis”.....	19
Figura 8 Mapa de distribución de los 21 individuos de <i>M. laticollaris</i> que forman parte del presente estudio.....	21
Figura 9 Electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en SDS.....	29
Figura 10 Perfiles cromatográficos de los individuos de <i>M. laticollaris</i> pertenecientes a Colima, Morelos y Guerrero.....	32
Figura 11 Mapa de calor ilustrando el porcentaje de abundancia de las principales fracciones letales en los individuos de <i>M. laticollaris</i>	34
Figura 12 Actividad PLA ₂ de los individuos de <i>M. laticollaris</i>	36

Figura 13 Fracciones analizadas, correspondientes a los perfiles cromatográficos de las mezclas por Estado y porcentaje de abundancia y masas de las 4 fracciones en las mezclas	38
Figura 14 Geles de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras, pertenecientes a las fracciones obtenidas por RP-HPLC de las mezclas por Estado.....	39
Figura 15 Actividad enzimática de las PLA ₂ B, C y D.....	40
Figura 16 Determinación de DL ₅₀ del veneno completo de las 3 mezclas por Estado de <i>M. laticollaris</i>	41
Figura 17 Determinación de la DL ₅₀ de las 4 toxinas purificadas de <i>M. laticollaris</i>	43
Figura 18 Determinación de la DL ₅₀ del individuo IBt-005 de Tecomán, Colima...	44
Figura 19 Reconocimiento de Coralmyn [®] hacia el veneno completo y las 4 toxinas purificadas de <i>M. laticollaris</i>	45
Figura 20 Determinación de la DE ₅₀ <i>i.v.</i> del antiveneno Coralmyn [®]	47
Figura 21 Perfiles obtenidos mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) del individuo IBt-005.....	50
Figura 22 Títulos de los antivenenos Anti- <i>M. nigrocinctus</i> experimental y Coralmyn [®] contra 6 especies de coralillos distribuidas a lo largo de América.....	53
Figura 23 Relación filogenética de algunas de las especies más representativas de coralillos (<i>Micrurus spp.</i>).....	55
Figura 24 Árbol de máxima verosimilitud generado a partir del análisis RAxML para el gen ND4.....	56
Figura 25 Títulos obtenidos por ELISA, usando dos lotes de Coralmyn [®] contra <i>M. limbatus</i> y <i>M. laticollaris</i>	59

Figura 26 Cantidades de veneno seco, reportado en mg, obtenidos por ordeña de diferentes ejemplares de *M. laticollaris*..... 61

III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Detalle del registro y la cantidad de veneno de los individuos de *M. laticollaris* usados para las mezclas por Estado..... 22

Tabla 2 Porcentaje de abundancia de las 4 principales fracciones letales de *M. laticollaris*..... 33

Tabla 3 Comparación de los ensayos de neutralización, de los dos lotes de Coralmy[®], contra las tres mezclas de Estado..... 48

Tabla 4 Potencia neutralizante de Coralmy[®] contra algunas especies de coralillos mexicanas..... 57

Tabla 5 Neutralización específica de diferentes lotes de Coralmy[®] contra coralillos mexicanas y las toxinas purificadas de *M. laticollaris*..... 58

Tabla 6 Comparación de la cantidad y DL₅₀s de MlatA1 alcanzada en humanos..... 62

IV. RESUMEN

Las serpientes de coral son el grupo más diversificado de elápidos en América, causantes del 1 al 2% de mordeduras en el continente, sin embargo, poseen componentes altamente neurotóxicos. La coral del Balsas (*Micrurus laticollaris*) es una especie endémica de México, cuyo veneno ha sido estudiado en años recientes, empero, no existe ningún estudio a nivel intraespecífico que indague en la variación de sus componentes. El presente trabajo se enfoca en la importancia de la variación de los componentes del veneno, tanto en su letalidad como su relevancia en la neutralización con el antiveneno comercial. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos (RP-HPLC) y electroforéticos (SDS-PAGE), de 21 individuos de *M. laticollaris* pertenecientes a los Estados de Morelos, Guerrero y Colima para determinar si existía variación en su composición. A partir de 3 mezclas de veneno por estado, se identificaron las principales neurotoxinas de tipo PLA₂, así como la 3Ftx MlatA1 mediante espectrometría de masas (ESI-MS). Además, se caracterizaron las toxinas mediante ensayos de actividad enzimática de PLA₂ en yema de huevo al 10%. Se determinó la letalidad de las 3 mezclas de veneno y las toxinas purificadas y se evaluó su reconocimiento, mediante ensayos de tipo ELISA, con dos lotes del antiveneno comercial Coralmy[®], para, finalmente determinar la capacidad neutralizante del mismo. Se observó que todos los individuos presentan diferencias en el porcentaje de componentes. La mezcla de Morelos presentó mayor letalidad. Los títulos de ELISA son menores para las PLA₂ que para MlatA1, indicando una mayor cantidad de anticuerpos específicos de PLA₂ en los viales de Coralmy[®]. Se necesita una gran cantidad de Coralmy[®] para neutralizar 3DL₅₀ de MlatA1, sin embargo, es posible neutralizar incluso 12DL₅₀ del veneno de un individuo que carece de esta. Con esto demostramos que la variación intraespecífica, en particular la presencia de la neurotoxina MlatA1, afecta la neutralización del veneno de *M. laticollaris* con este antiveneno.

1. Introducción

1.1. Las serpientes

Al hablar de serpientes no podemos pasar por alto su alargado cuerpo y obviada falta de extremidades, pero esta morfología también existe en otros grupos del orden Squamata. Sin embargo, las serpientes no presentan esternón, así como cinturas pectoral y pélvica, aunque en algunos grupos podemos encontrar vestigios de ésta última. Las serpientes del suborden “Serpentes”, aparecen por primera vez en el registro fósil del cretáceo temprano hace 127-121 millones de años (Vitt y Caldwell, 2014). Además, son el segundo grupo con mayor cantidad de especies entre los reptiles de todo el mundo (Uetz *et al.*, 2023). Se distribuyen en todos los continentes, a excepción de la Antártida y algunas islas, o en latitudes y altitudes muy elevadas (Vitt y Caldwell, 2014).

A nivel mundial existen 27 familias de serpientes, con un total de 4038 especies, aunque se reconoce que al menos 4 familias son de importancia médica, destacan las familias Elapidae y Viperidae, tanto por su distribución (con presencia prácticamente cosmopolita, exceptuando la Antártida), como por la letalidad de sus venenos (Chippaux, 2017; Uetz *et al.*, 2023; Vitt y Caldwell, 2014; Zheng y Wiens, 2016). La familia Elapidae se distribuye en América, África, Asia y Oceanía, así como en los Océanos Índico y Pacífico, comprendiendo a nivel mundial 400 especies (Uetz *et al.*, 2023; Vitt y Caldwell, 2014). En América, se tiene registro de 94 especies pertenecientes a los géneros *Hydrophis*, *Micrurus* y *Micruroides* (Campbell y Lamar, 2004; Uetz *et al.*, 2023; Wallach *et al.*, 2014). En México pueden encontrarse los tres géneros con 17 especies totales, 15 pertenecientes al género *Micrurus*, una serpiente marina, *Hydrophis platurus* y una especie monotípica, *Micruroides euryxanthus* (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014; Johnson *et al.*, 2017). Sin embargo, Reyes-Velasco *et al.*, (2020), a partir de ADN mitocondrial, sugirieron cambios taxonómicos que resultarían en un total de 14 especies de coralillos, pertenecientes al género *Micrurus*, con distribución en México.

1.2. Serpientes de coral

Las serpientes de coral de los géneros *Micrurus* y *Micruroides* se caracterizan por una coloración generalmente en anillos negros, rojos y blancos o amarillos, aunque a lo largo de su distribución presentan patrones de coloración muy variados (Ramírez-Bautista *et al.*, 2014). Poseen dos dientes acanalados, que les permiten inocular veneno, al frente del hueso maxilar, dentición conocida como proteroglifa. Cada uno de ellos está conectado a una glándula de veneno localizada abajo y hacia atrás de los ojos (Figura 1) (Kardong, 2012; Vitt y Caldwell, 2014; Weinstein *et al.*, 2010).

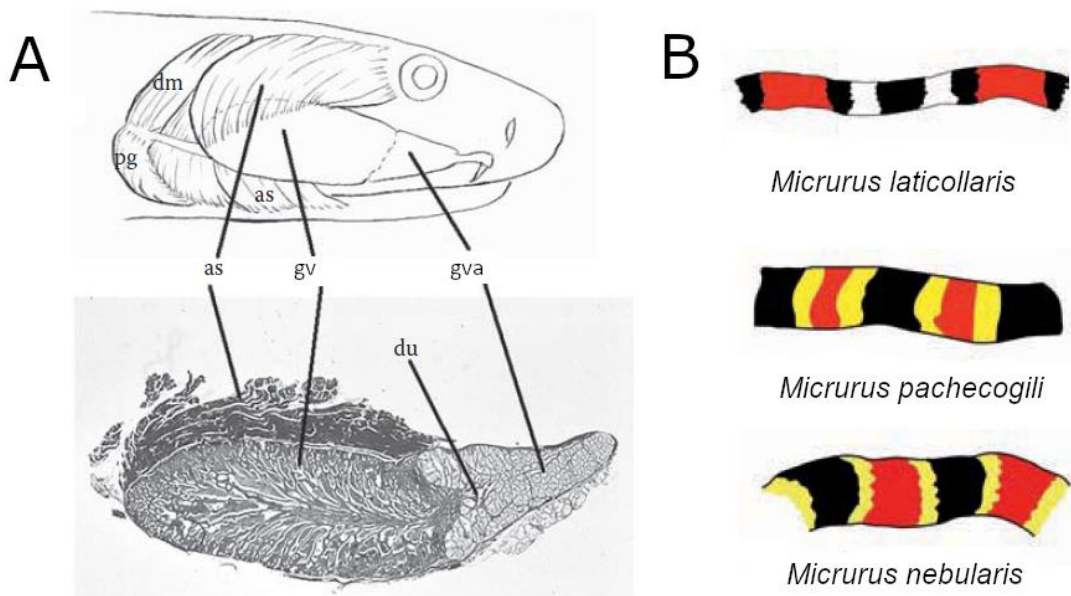


Figura 1. A) Cabeza de una serpiente elápidica mostrando a detalle la glándula de veneno: Músculo adductor superficialis (as) que se inserta directamente sobre la glándula de veneno principal (gv). Glándula de veneno accesoria (gva), conducto de veneno (du), músculo depressor mandibulae (dm), músculo pterigoideo (pg). Histomicrografía de la glándula de veneno de *Walterinnesia aegyptii*. **B)** Patrón de coloración de algunas especies de coralillos mexicanas: *M. laticollaris* con un patrón de coloración en tríadas, *M. pachecogili* y *M. nebularis* con un patrón de coloración monadal. Tomado y modificado de Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010 y Weinstein *et al.*, 2010.

Son de hábitos generalmente semifosoriales, secretivos y terrestres, aunque existen especies asociadas a cuerpos de agua. Es digno de mención que

se han reportado posibles conductas arborícolas en diferentes especies (Dávila *et al.*, 2014; Roze, 1996; Valencia-Herverth *et al.*, 2016). Tienen patrones de actividad diurnos, nocturnos o crepusculares y habitan zonas desérticas, templadas y tropicales (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010; Ramírez-Bautista *et al.*, 2014; Roze, 1996). Se alimentan principalmente de vertebrados ectotermos como serpientes, lagartijas, peces, cecílicos y anfisbénidos (Jackson y Franz, 1981; Marques-Souza *et al.*, 2011; Marques y Sazima, 1997). Se distribuyen a lo largo de América desde el centrosur y sureste de Estados Unidos al noreste de Argentina, exceptuando algunas zonas con un clima extremo, como el desierto chihuahuense en México, así como la mayor parte de la cordillera de los Andes, desde el centro de Perú hasta el sur de Chile y la Patagonia argentina (Roze, 1996; Vitt y Caldwell, 2014).

1.3. Características de *Micrurus laticollaris*

Micrurus laticollaris es una serpiente de coral con un patrón de coloración en tríadas (Figura 2A), conocida como la serpiente de coral del Balsas, debido a su distribución a lo largo de la cuenca del Río Balsas en el centro-oeste de México, en elevaciones que van de los 300 a los 1,900 metros sobre el nivel del mar (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010; Roze, 1996). Se reconocen dos subespecies, *M. laticollaris laticollaris* cuya distribución abarca los Estados de Puebla, Oaxaca, Guerrero, Morelos y Michoacán y *M. laticollaris maculirostris* que se distribuye en la costa del Pacífico, en Colima y Jalisco (Figura 2B) (Roze, 1996). Habita principalmente en el bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y sólo ocasionalmente se le encuentra en bosques de pino-encino (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010; Heimes, 2016). Al igual que otros coralillos, se alimentan principalmente de vertebrados como serpientes, lagartijas y anfisbénidos, entre los cuáles resalta *Bipes canaliculatus* que comparte parte de su distribución con *M. laticollaris* a lo largo del río Balsas, por lo cual, Papenfuss sugirió que esta serpiente podría ser especialista de *B. canaliculatus* (GBIF, 2024; Heimes, 2016; Papenfuss, 1982 en Heimes, 2016).

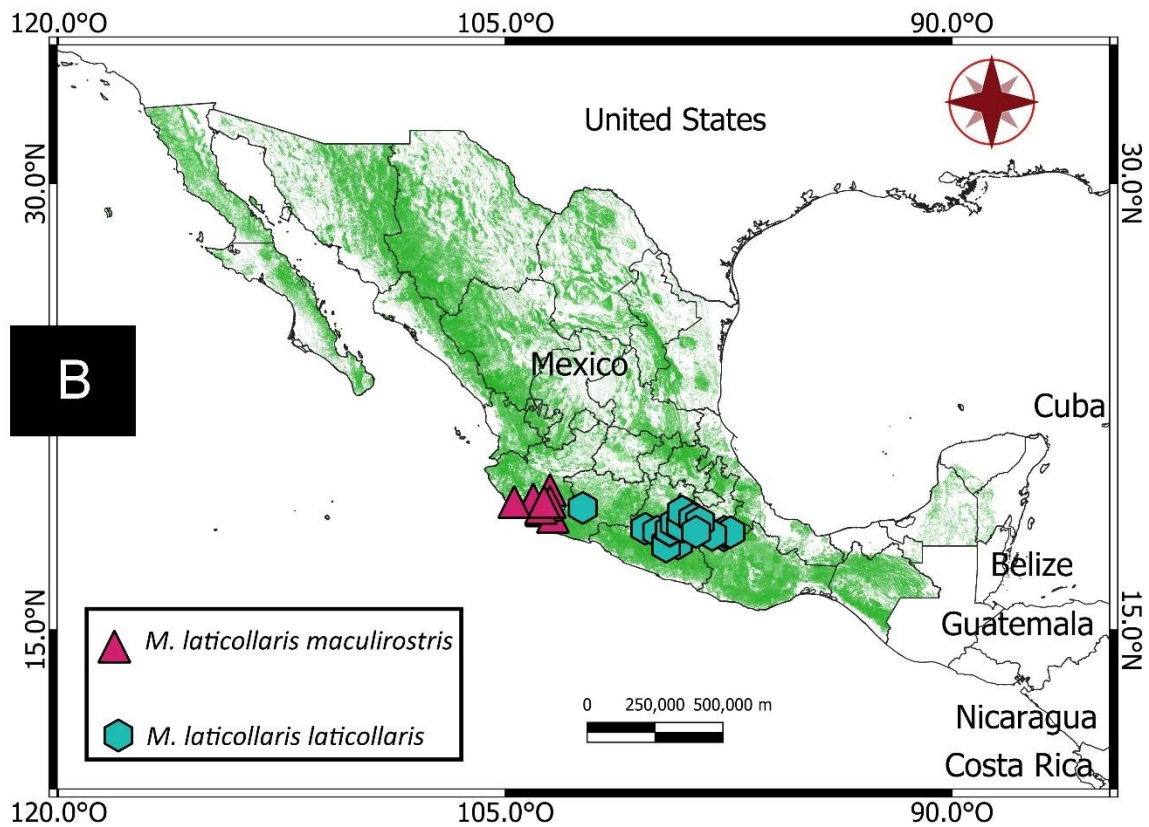


Figura 2. A) Individuos de *M. laticollaris laticollaris* del Herpetario Cantil IBt-UNAM. **B)** Mapa de distribución de *Micrurus laticollaris* con las dos subespecies conocidas. Elaboración personal. Registros de localidades tomados de GBIF 2024 y del Herpetario Cantil IBt-UNAM. Curvas de nivel 1:250,000 INEGI 2023. Shapefile INEGI 2019. Fotografías tomadas por Rodríguez Barrera O. G.

1.4. Epidemiología

Se estima que, a nivel mundial, no menos de 7,400 personas son mordidas cada día por una serpiente, sumando más de 2.7 millones de envenenamientos cada año, de los cuales se registran entre 81,000 y 138,000 muertes, principalmente en áreas tropicales y subtropicales de África sub-Sahariana, Sur y Sureste de Asia, así como en Latinoamérica (Boyer *et al.*, 2015; WHO, 2019). En América ocurren cerca de 60,000 mordeduras por serpiente cada año, de las cuales las serpientes de coral (*Micrurus* y *Micruroides*), únicamente son responsables del 1 al 2% (Castillo-Beltrán *et al.*, 2019; Chippaux, 2017).

En México ocurren anualmente un promedio de 4,000 mordeduras por serpientes, con menos de 50 muertes por año (Chippaux, 2017). Sin embargo, las secuelas (que pueden ser incluso permanentes) como pérdida de funcionalidad, úlceras crónicas, hinchazón y dolor local crónico, enfermedad renal crónica, parálisis neuromuscular y afecciones neurológicas, ceguera y amputaciones, por mencionar algunos de los efectos a largo plazo mejor conocidos, son más comunes que los decesos provocados por envenenamiento ofídico (Boyer *et al.*, 2015; Waiddyanatha *et al.*, 2019). Bolaños *et al.*, (1978) sugieren, de acuerdo con observaciones de los autores, que *Micrurus diastema*, *Micrurus distans* y *Micrurus laticollaris* son las serpientes de coral de mayor importancia médica en México. Resulta importante la ausencia de información epidemiológica actualizada, que permita identificar a las especies involucradas en los accidentes ofídicos.

1.5. Composición del veneno

El veneno de las serpientes de coral está compuesto en su mayor parte por proteínas, de hasta 11 familias diferentes. Entre estas, las toxinas de tres dedos (3FTx), las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y las metaloproteasas (SVMP) representan los componentes más abundantes (Lomonte *et al.*, 2016; Mackessy, 2010). Otras familias proteicas, presentes en menor o mayor medida en estos venenos son serinoproteasas, péptidos Kunitz, L-aminoácido-oxidasas (LAAO),

acetilcolinesterasas, proteínas secretadas ricas en cisteína (CRiSP), entre otras. Los componentes no proteicos incluyen iones metálicos, carbohidratos, nucleósidos, aminas biogénicas, aminoácidos y lípidos (Lomonte *et al.*, 2016).

Se ha sugerido que existe una dicotomía en la abundancia de 3FTxs y PLA₂ a lo largo del continente americano, de manera que las especies de Sudamérica presentan mayor abundancia de 3FTxs y las de Norteamérica mayor cantidad de PLA₂; en Centroamérica dicho patrón es variable (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Bénard-Valle *et al.*, 2020; Corrêa-Netto *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2011; Lomonte *et al.*, 2016; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Rey-Suárez *et al.*, 2016; Rey-Suárez *et al.*, 2011). Sin embargo, se han reportado al menos dos excepciones, tal es el caso del complejo *Micrurus lemniscatus* y de *Micrurus corallinus*, denotando lo mucho que aún desconocemos acerca de los venenos de este grupo (Aird *et al.*, 2017; Sanz *et al.*, 2019).

En México, a la fecha, sólo se han estudiado los venenos de algunas especies: *M. tener*, *M. browni*, *M. laticollaris*, *M. diastema* y *M. distans*, las cuales presentan una mayor abundancia de PLA₂, seguidas de 3FTxs (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Bénard-Valle *et al.*, 2020; Campos-Arce, 2022; Carbajal-Saucedo, 2014; Yañez-Mendoza, 2024). Por su parte, *Micruroides euryxanthus*, una especie basal en la filogenia de las serpientes de coral americanas presenta un patrón mayoritario de 3FTxs (Bénard-Valle *et al.*, 2021; Jowers *et al.*, 2019).

1.6. Toxinas de tres dedos

Las toxinas de tres dedos (3FTxs) son péptidos no enzimáticos cuyo nombre proviene de su estructura característica con un centro hidrofóbico del cual sobresalen tres asas que se asemejan a los dedos de una mano. Dichos péptidos tienen entre 60 y 74 aminoácidos, aunque se ha reportado que en ciertas toxinas apotípicas (evolutivamente derivadas) pueden tener cerca de 90 (Utkin *et al.*, 2015).

La familia de las 3FTxs es una de las más amplias dentro del veneno de las serpientes y poseen una amplia variedad de efectos ya que se unen a distintos receptores (Ranawaka *et al.*, 2013). Las más comunes en la familia Elapidae son las α -neurotoxinas, aunque también se conocen citotoxinas, cardiotoxinas e inhibidores de agregación plaquetaria (Utkin *et al.*, 2015).

Fry *et al.*, (2013) a partir de los transcriptomas obtenidos de las glándulas orales y de veneno de diferentes especies de serpientes sugieren que, las 3FTxs están presentes de forma basal en la filogenia de las serpientes, exceptuando a los grupos Scolecophidia y Amerophidia; algunos clados perdieron estas toxinas de forma secundaria. Se han descrito diferentes 3FTxs en serpientes de la familia Colubridae, además, se han encontrado en algunas especies de la familia Viperidae aunque en baja proporción (Fry *et al.*, 2003; Hegde *et al.*, 2010; Heyborne y Mackessy, 2013; Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que la acción plesiotípica (función evolutiva basal) de las 3FTxs es comportarse como α -neurotoxinas, o toxinas postsinápticas. Éstas son antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), es decir, compiten con el neurotransmisor acetilcolina (ACh), al unirse al nAChR localizado en la placa neuromuscular (Ranawaka *et al.*, 2013; Utkin *et al.*, 2015). Cabe resaltar que diferentes 3FTxs, como la α -bungarotoxina o la α -cobratoxina, tienen la capacidad de unirse a los receptores neuronales $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChRs) (Barber *et al.*, 2013; Ranawaka *et al.*, 2013).

Las 3FTxs se dividen en 3 grupos principales: de cadena corta (60 a 62 residuos de aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro conservados), de cadena larga (66 a 74 residuos de aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro conservados, con un enlace disulfuro adicional en la punta del *loop* II) y neurotoxinas no convencionales (Dashevsky y Fry, 2018; Hegde *et al.*, 2010; Ranawaka *et al.*, 2013; Utkin *et al.*, 2015). En el veneno de las serpientes de coral se han registrado mayoritariamente 3FTxs de cadena corta (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Guerrero-Garzón *et al.*, 2018; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008), no obstante, Moreira *et al.*, (2010) secuenciaron a partir del veneno de *M. frontalis* dos toxinas con 64 aminoácidos y

un par de cisteínas extra (Cys 6 y Cys11, Frontoxinas IV y V), que de acuerdo con los autores podrían estar formando un quinto enlace disulfuro en el loop I, lo que las clasificaría como neurotoxinas no convencionales (Hegde *et al.*, 2010; Utkin, 2015). Un caso similar fue encontrado en algunas toxinas de *M. surinamensis* (Ms2, Ms4 y Ms5), donde además de presentar 64 aminoácidos, las toxinas Ms4 y Ms5 mostraron ser letales en peces, pero no en ratones (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). En el veneno de *M. pyrrhocryptus* se encontró una 3FTx, de 64 aminoácidos y 10 cisteínas, con la capacidad de reducir la corriente de ACh en experimentos de electrofisiología con células de rhabdomiosarcoma (Olamendi-Portugal *et al.*, 2018).

1.7. Fosfolipasas A₂

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son enzimas que hidrolizan el enlace éster de los glicerofosfolípidos, localizado en la posición *sn*-2, lo cual resulta en la liberación de un lisofosfolípido y un ácido graso (Sunagar *et al.*, 2015).

Las PLA₂ secretadas e intracelulares han sido clasificadas en 15 grupos, pero, de acuerdo con las secuencias de aminoácidos, la estructura tridimensional y el patrón de enlaces disulfuro, el veneno de las serpientes contiene PLA₂ de los grupos I y II. Las enzimas de estos grupos poseen una masa molecular de entre 13 y 18 kDa, además, para llevar a cabo su actividad catalítica necesitan unirse a un ion Ca²⁺ (Burke y Dennis, 2009; Doley *et al.*, 2010).

El veneno de las serpientes de la familia Elapidae contiene PLA₂ pertenecientes al grupo I, que se caracterizan por poseer una extensión denominada *loop* elapídico, localizado entre la segunda α -hélice y la lámina- β (Doley *et al.*, 2010; Sunagar *et al.*, 2015). Estas enzimas típicamente contienen de 115-120 residuos de aminoácidos con 7 enlaces disulfuro. El enlace localizado entre los residuos de cisteína 11 y 77 es exclusivo de este grupo (Doley *et al.*, 2010).

Las PLA₂ pueden tener una amplia variedad de efectos farmacológicos, tales como: neurotoxicidad, miotoxicidad, efectos anticoagulantes, inhibición de la agregación plaquetaria, actividad hemolítica, entre otros (Doley *et al.*, 2010). En específico, las PLA₂ neurotóxicas actúan sobre las terminales de los nervios motores, interfiriendo con la liberación de ACh y posteriormente degradando la membrana del botón presináptico. A este tipo de neurotoxinas enzimáticas se les conoce como β -neurotoxinas (Ranawaka *et al.*, 2013; Sunagar *et al.*, 2015).

En la clínica, la acción conjunta de las α y β neurotoxinas, genera un cuadro de envenenamiento caracterizado por parálisis flácida. Al evitar la comunicación en la placa neuromuscular, produce diversos síntomas que van desde ptosis palpebral, debilidad muscular y debilidad en las extremidades hasta insuficiencia respiratoria (Boyer *et al.*, 2015; Ranawaka *et al.*, 2013). Adicionalmente se ha reportado que el veneno de diferentes especies de serpientes de coral también es capaz de generar daños locales como mionecrosis, edema y hemorragia en modelos animales experimentales (Barros *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2011). Al menos dos especies mexicanas (*M. browni* y *M. laticollaris*) han mostrado la capacidad de generar daño renal en modelos de órganos aislados (Carbajal-Saucedo, 2014; Braga *et al.*, 2020).

1.8. Antivenenos

A la fecha, el único tratamiento que ha probado ser efectivo para atender un envenenamiento es el uso del antiveneno, compuesto por inmunoglobulinas (o fragmentos de éstas) purificadas a partir del suero o plasma sanguíneo de animales hiperinmunizados (Bénard-Valle *et al.*, 2015; Morais y Massaldi, 2009). No obstante, estos deben cumplir ciertas condiciones que garanticen su efectividad: alta potencia neutralizante contra los componentes toxicológicamente relevantes del veneno, un volumen de distribución que les permita llegar hasta las toxinas que ya han sido absorbidas y alta vida media en circulación sistémica para garantizar la neutralización de las toxinas (Bénard-Valle *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2003; WHO, 2017).

Actualmente todos los antivenenos usados clínicamente, se desarrollan a través de la inmunización, típicamente, de grandes mamíferos, principalmente caballos y ovejas, sin embargo, también se han desarrollado sueros experimentales usando cabras, burros, camellos, llamas, conejos, ratones y huevos de gallina (Bénard-Valle *et al.*, 2015; Kalliyana-Krishnan *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2021). Una vez determinada la toxicidad de los venenos utilizados para la inmunización, se inyecta a los animales con dosis no letales de veneno, para producir un suero hiperinmune al que se le deben realizar ensayos de potencia neutralizante en diferentes momentos, para probar la eficacia y la estabilidad (Bénard-Valle *et al.*, 2015; Castillo-Beltrán *et al.*, 2019; Morais y Massaldi, 2009).

Los primeros antivenenos, conocidos actualmente como antivenenos de primera generación, estaban hechos del suero completo de animales hiperinmunizados (Pucca *et al.*, 2019). Al contener una gran cantidad de proteínas, entre ellas albúmina, las reacciones adversas eran muy comunes (Bénard-Valle *et al.*, 2015). Con la finalidad de reducir las reacciones alérgicas, se optó por purificar las inmunoglobulinas G (IgGs) a partir de los sueros hiperinmunizados usando sulfato de amonio, que precipita las IgGs separándolas del resto de componentes del plasma, o con ácido caprílico, que precipita las proteínas no inmunes permitiendo obtener de forma soluble las IgGs; estos antivenenos son llamados de “segunda generación”. Los antivenenos actuales se componen de IgGs completas o fragmentos de ellas, los cuáles son obtenidos a partir de digestión enzimática con papaína, que resulta en fragmentos Fab, o con pepsina que permite obtener los fragmentos F(ab')₂. Los antivenenos producidos a partir de dichos fragmentos se conocen como faboterápicos o de tercera generación (Bénard-Valle *et al.*, 2015). Los fragmentos Fab y F(ab')₂ tienen un mayor volumen de distribución en los organismos en comparación con las IgGs, debido a su bajo peso molecular, aunque el tiempo de eliminación medio de los Fab resulta generalmente menor. Es relevante considerar que usar un antiveneno, con un perfil farmacocinético similar al de los componentes del veneno, facilita su efectividad (Gutiérrez *et al.*, 2003). Actualmente se reconoce la importancia del sistema linfático en el tratamiento del

accidente ofídico, ya que podría funcionar como un reservorio de veneno a partir del cual las toxinas se difunden lentamente al torrente sanguíneo (Paniagua *et al.*, 2012).

A lo largo de América se han desarrollado diferentes antivenenos específicos para coralillos, los cuales han sido producidos por diferentes laboratorios como Wyeth (E.U.A., actualmente discontinuado), Instituto Bioclón (actualmente producido por Laboratorios Silanes en México), Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica), Instituto Butantan (Brasil), el Instituto Nacional de Producción de Biológicos (Argentina), Laboratorios Probiol (Colombia) y el Instituto Nacional de Salud (Colombia) (de Roodt *et al.*, 2004; de Root *et al.*, 2021). Diferentes autores concuerdan en la dificultad para producir los antivenenos contra las serpientes de coral, debido a factores intrínsecos a estas serpientes como la alta mortalidad en cautiverio, ya que poseen dietas muy específicas, y la baja cantidad de veneno que puede extraerse en cada ordeña (Castillo-Beltrán *et al.*, 2019; de Roodt *et al.*, 2004).

Diversos estudios se han enfocado en definir los límites de acción de dichos antivenenos, ya que, aunque existe una alta reactividad cruzada, no todos los antivenenos neutralizan el veneno de las mismas especies, ni con el mismo grado de eficacia (Bolaños *et al.*, 1975; de Roodt *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2017).

2. Antecedentes

2.1. Variación intraespecífica en venenos de serpientes de coral

La variación intraespecífica ha sido poco estudiada en las serpientes de coral. En 2011, Rey-Suárez *et al.*, caracterizaron el veneno de la serpiente *Micrurus mipartitus*, usando dos mezclas de veneno con individuos de dos poblaciones diferentes: 5 pertenecientes al suroeste de Antioquia en Colombia y 2 de la provincia Alajuela en Costa Rica. Los autores reportaron que el veneno se

compone mayoritariamente de 3FTxs. Además, observaron una posible variación poblacional, cercana al 20%, en la abundancia de 3FTxs y PLA₂ (Figura 3). Sin embargo, la población de Costa Rica podría pertenecer a *M. multifasciatus*, ya que, de acuerdo con Roze (1996), la distribución de *M. mipartitus* abarca únicamente del centro-este de Panamá hasta el norte de Perú y Brasil, por lo tanto, los registros de Costa Rica podrían pertenecer a *M. multifasciatus hertwigi*. Aunado a ello, existe una amplia controversia entre los caracteres que separan a ambas especies, llegando a encontrarse poblaciones de *M. mipartitus* con una coloración similar a *M. multifasciatus*, por lo que, algunos autores consideran que son la misma especie (Rios-Soto *et al.*, 2018; Wallach *et al.*, 2014). Slowinski (1995) sugiere, de acuerdo con la morfología de los hemipenes, que las especies *M. mipartitus* y *M. multifasciatus* son monofiléticas junto a *M. spurrelli* y *M. multiscutatus*. Empero, a la fecha no existen filogenias que incluyan caracteres moleculares de estas especies a lo largo de su distribución y que permitan esclarecer su situación taxonómica (Rios-Soto *et al.*, 2018; Lomonte *et al.*, 2016).

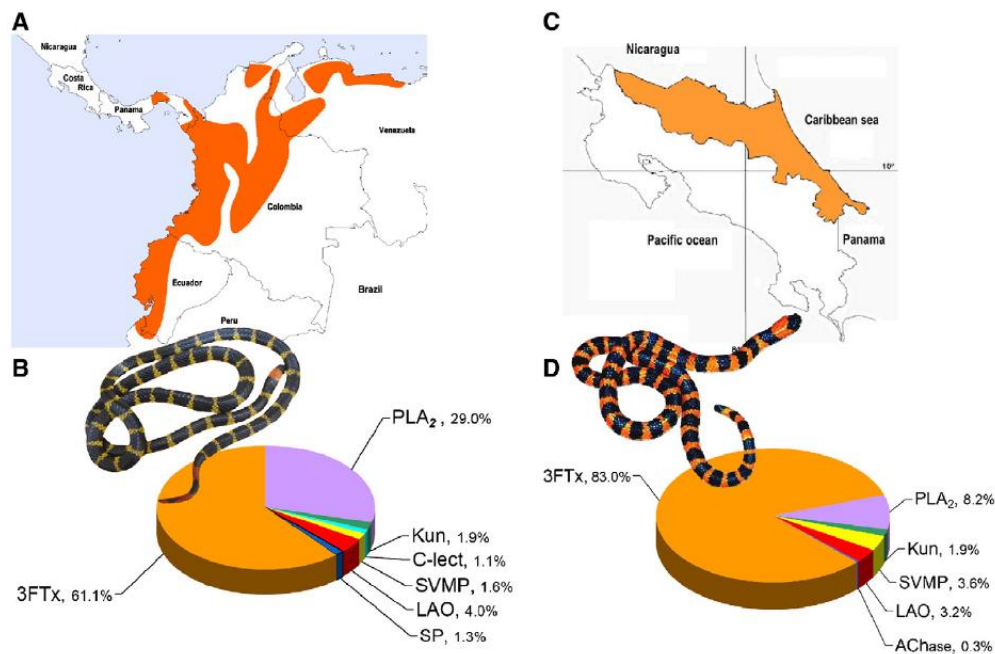


Figura 3. Distribución de *M. mipartitus* en Colombia (**A**) y de *M. multifasciatus* en Costa Rica (**C**). **B:** Composición del veneno de *M. mipartitus* de Colombia. **D:** Composición del veneno de *M. multifasciatus* de Costa Rica. Tomado de Rey-Suárez *et al.*, 2011.

Lomonte *et al.*, (2016) indican la caracterización del veneno, de las dos poblaciones identificadas como *M. mipartitus* realizada por Rey-Suárez *et al.*, (2011), como perteneciente a *M. mipartitus* y *M. multifasciatus*, a pesar de ello no dan más detalles al respecto. Considerando lo anterior, podemos denotar que las especies *M. mipartitus* y *M. multifasciatus* presentan en su veneno Mipartoxina-I, una 3FTx que se ha demostrado posee un efecto de tipo α -neurotoxina, en preparaciones de nervio frénico-diafragma de ratón y en “biventer cervicis” de pollo (Figura 4) (Rey-Suárez *et al.*, 2011; Rey-Suárez *et al.*, 2012).

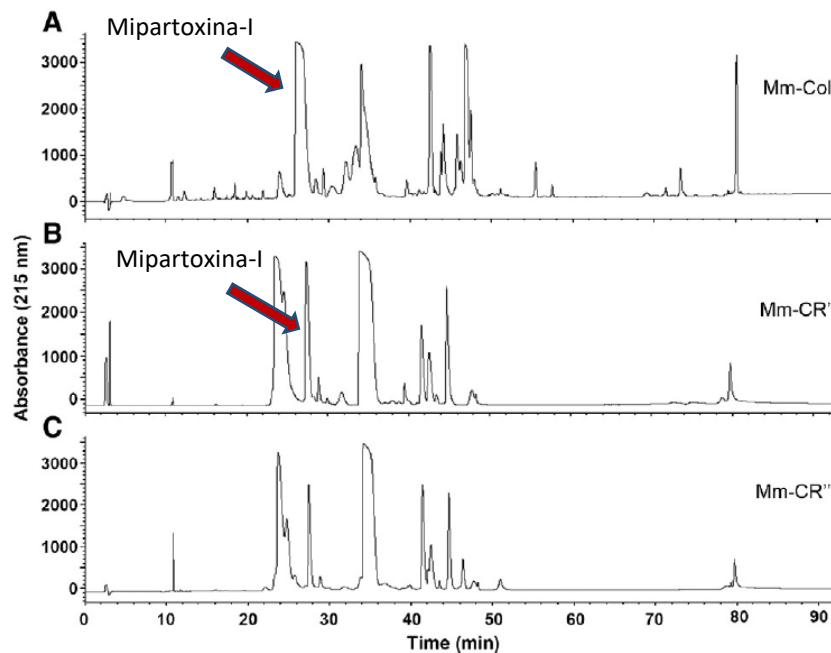


Figura 4. Comparación de perfiles del veneno, obtenidos mediante RP-HPLC de *M. mipartitus* de Colombia (A) y dos individuos de *M. multifasciatus* de Costa Rica (B y C). La flecha roja señala la α -neurotoxina Mipartoxina-I. Tomado y modificado de Rey-Suárez *et al.*, 2011.

Posteriormente, Henao-Duque y Núñez-Rangel (2016) analizaron el veneno de 7 individuos, de *M. mipartitus*, pertenecientes a la región suroeste de Antioquia, en Colombia. Mediante el fraccionamiento del veneno de los individuos, usando cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC), encontraron que la mayoría de los perfiles mostraban similitud en los tiempos de

retención y la abundancia de las proteínas. Sin embargo, resalta la ausencia, en un individuo, de Mipartoxina-I.

2.2. Neutralización de venenos de serpientes de coral

Tomando en cuenta la variación interespecífica de PLA₂ y 3FTxs en las serpientes de coral, Castillo-Beltrán *et al.*, (2019), evaluaron un antiveneno polivalente, producido y comercializado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en Colombia, bajo el nombre de “Antiveneno Anticoral Polivalente”, el cual se compone de la mezcla de 4 sueros experimentales monovalentes, producidos en caballos, con el veneno de *Micrurus dumerilii*, *M. isozonus*, *M. mipartitus* y *M. surinamensis*, los cuales fueron purificados mediante el uso de sulfato de amonio para obtener las IgGs. Al probar la capacidad neutralizante de cada suero experimental contra los venenos homólogos, encontraron que todos eran neutralizados, sin embargo, *M. surinamensis*, cuyo veneno se compone mayoritariamente de 3FTxs (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Sanz *et al.*, 2019), fue la peor neutralizada, mientras que *M. isozonus* mostró los mejores rendimientos, aunque a la fecha no existe una caracterización del veneno de esta especie que nos permita compararla. El antiveneno polivalente, por su parte, mostró una amplia capacidad de neutralización contra los 4 venenos usados como inmunógenos, así como 3 heterólogos, lo que denota la importancia de usar diferentes especies como inmunógenos. Los autores concluyen que hacen falta más estudios con las demás especies de *Micrurus* para determinar su eficacia, ya que tanto *M. surinamensis* como *M. dumerilii*, necesitan una alta cantidad de antiveneno para ser neutralizadas (>200 mg de antiveneno por 1 mg de veneno). Silva-Carvalho *et al.*, (2022) sugieren que pese a que el veneno de *M. dumerilii* posee mayoritariamente PLA₂ (52%) (Rey-Suárez, *et al.*, 2016), las 3FTxs juegan un papel importante en la letalidad de esta especie. Aunado a esto, encontramos que aún se desconoce, tanto la composición del veneno como la variación intraespecífica, de muchas serpientes de este grupo (Lomonte *et al.*, 2016).

Lomonte *et al.*, (2016) encontraron que el veneno de *Micrurus clarki*, una especie con predominancia de 3FTxs (48.2%), es neutralizado por un antiveneno hecho a partir de la inmunización con veneno de *M. nigrocinctus*, cuyo componente mayoritario son las PLA₂ (Fernandez *et al.*, 2011). De acuerdo con los autores, la letalidad en *M. clarki*, parece deberse principalmente a una PLA₂ que equivale a cerca del 5% del veneno total, mientras que ninguna de las 3FTxs aisladas mostró actividad letal en ratones.

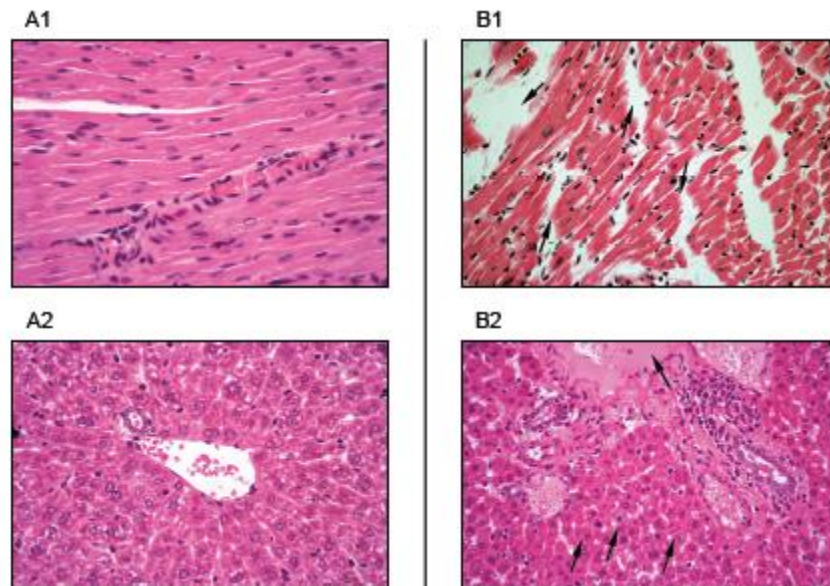
El antiveneno usado en México para tratar el envenenamiento por coralillos, comercializado bajo el nombre de Coralmy[®], está conformado por fragmentos F(ab')₂ producidos a partir de IgGs equinas. Originalmente se utilizaba como inmunógeno el veneno de *M. nigrocinctus* (Sánchez *et al.*, 2008), pero actualmente se han incluido otras especies al esquema de inmunización. Desafortunadamente, los productores no especifican las especies utilizadas.

De Roodt *et al.*, (2004) reportaron que lotes de Coralmy[®], que usaron como inmunógeno a *M. nigrocinctus*, son capaces de neutralizar el veneno de *M. nigrocinctus* y el de *M. fulvius*. Sin embargo, Yang *et al.*, (2017) encontraron que este antiveneno no neutraliza bien a *M. tener* ni a *Micruroides euryxanthus*, ambas especies presentes en Norteamérica. Las serpientes *M. spixii*, *M. pyrrhocryptus* y *M. surinamensis*, las cuales están distribuidas en Sudamérica y presentan altas proporciones de 3FTxs con algunas α -neurotoxinas caracterizadas, tampoco son neutralizadas por este antiveneno, aunque se conoce al menos una PLA₂ letal en el veneno de *M. spixii* (de Roodt *et al.*, 2004; Dokmetjian *et al.*, 2009; Terra *et al.*, 2015; Sanz *et al.*, 2019; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Olamendi-Portugal *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017). Sánchez *et al.*, (2008) reportan neutralización por Coralmy[®] hacia el veneno de *M. tener* y *M. fulvius*, lo que sugiere que existe una importante variación en la capacidad neutralizante del antiveneno entre lotes o en el veneno de las serpientes de coral. Así mismo, estas investigaciones sugieren que los venenos con predominancia de PLA₂ letales son bien neutralizados por Coralmy[®] y que no hay buena neutralización de las 3FTxs, como se puede apreciar en *M. tener*, cuyo veneno se compone mayoritariamente de PLA₂, pero

también se ha encontrado la α -neurotoxina D.H., presente en *M. diastema* y *M. browni* (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Bénard-Valle *et al.*, 2020; Guerrero-Garzón *et al.*, 2018).

2.3. Estudios previos del veneno de *Micrurus laticollaris*

Carbajal-Saucedo (2014) realizó la caracterización del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticollaris*, usando una mezcla de 7 individuos provenientes de Morelos, Guerrero y Michoacán. Observó que su veneno se compone principalmente de PLA₂, muchas de ellas con actividad letal, y un bajo porcentaje de 3FTxs, destacando una 3FTx letal de tipo α -neurotoxina denominada MlatA1. El autor también reportó la existencia de alteraciones tisulares en corazón, pulmón, hígado y riñones de ratones visualizado mediante cortes histológicos (Figura 5).



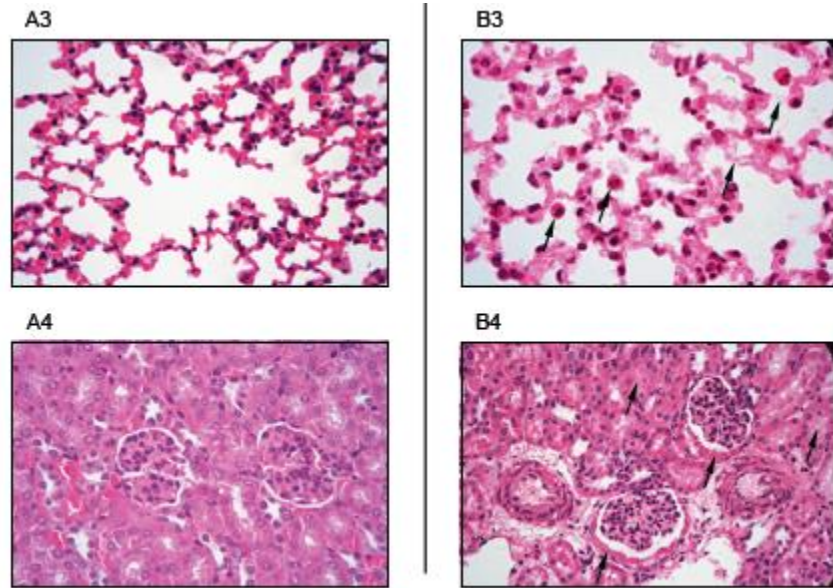


Figura 5. Alteraciones tisulares generadas por la administración endovenosa de veneno de *M. laticollaris*. Muestras de corazón (1), hígado (2), pulmón (3) y riñón (4), tomadas inmediatamente después de la muerte de los ratones, fijadas y teñidas con hematoxilina/eosina. **A)** Control con PBS; **B)** Veneno (3 DL₅₀/ratón). Las flechas señalan: **B1)** la infiltración de líquido y pérdida de estructura de las fibras del miocardio; **B2)** aparición de material proteináceo y vesículas necróticas en células hepáticas; **B3)** pérdida de la estructura y ruptura de paredes, así como presencia de macrófagos alveolares y; **B4)** presencia de material proteináceo en el espacio glomerular, así como en la luz de los túbulos proximales. Tomado de Carbajal-Saucedo, 2014.

Los efectos nefrotóxicos provocados por el veneno completo de *M. laticollaris*, fueron descritos usando un modelo aislado de riñón perfundido por Braga *et al.*, (2020) (Figura 6), además evaluaron la citotoxicidad *in vitro* en un cultivo celular renal LLC-MK2 (línea celular de epitelio de riñón de mono), encontrando que la viabilidad se veía reducida significativamente con una concentración mínima de 25 µg/ml. Esto complementa la información sobre daños en el tejido renal, reportados por Carbajal-Saucedo (2014) en ratones. Además, se ha reportado que el veneno de *M. laticollaris* tiene alta capacidad anticoagulante *in vitro*, en comparación con otras especies de *Micrurus* (Dashevsky *et al.*, 2021).

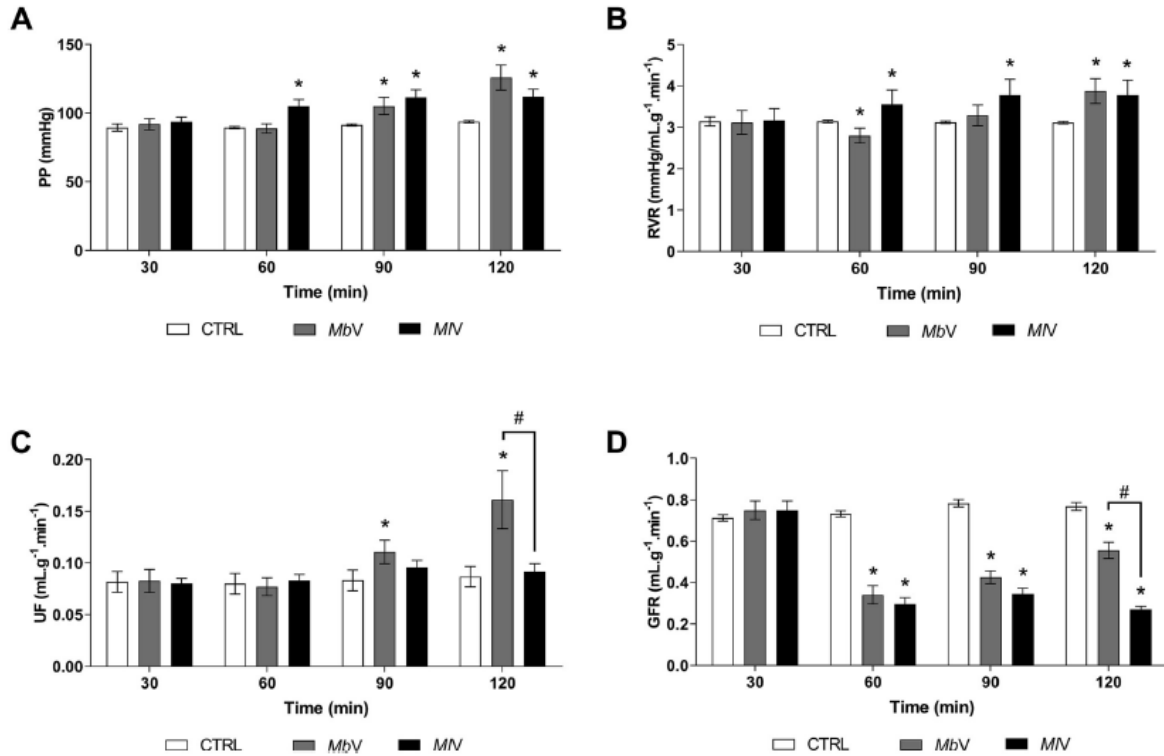


Figura 6. Efectos del veneno (10 $\mu\text{g/mL}$) de *M. browni* (*MbV*) y *M. laticollaris* (*MNV*), sobre la presión de perfusión (PP; **A**); resistencia vascular renal (RVR; **B**); flujo urinario (UF; **C**); tasa de filtración glomerular (GFR; **D**). Control (CTRL): riñones perfundidos únicamente con solución de perfusión. El veneno fue agregado 30 minutos después de la perfusión (tiempo 0). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) por cada grupo ($n=6$). Comparación entre los diferentes tiempos (60, 90 y 120 minutos después de la perfusión): * $p < 0.05$. Comparación entre los mismos tiempos y los diferentes grupos de veneno (*MbV* o *MNV*): * $p < 0.05$. Tomado de Braga *et al.*, 2020.

En ensayos de unión neuromuscular, el veneno completo de *M. laticollaris*, inhibe la contracción muscular sobre “biventer cervisis” de pollo (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2014) (Figura 7A). Pese al bajo porcentaje de 3FTxs en el veneno, destaca una α -neurotoxina, denominada MlatA1, la cual ha mostrado tener una fuerte acción sobre dos subtipos de receptores nicotínicos de ACh de músculo esquelético de ratón ($\alpha\beta\epsilon\delta$ de adulto y $\alpha\beta\gamma\delta$ fetal) y un subtipo neuronal humano (α -7), expresados en oocitos de la rana *Xenopus laevis* (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013) (Figura 7B).

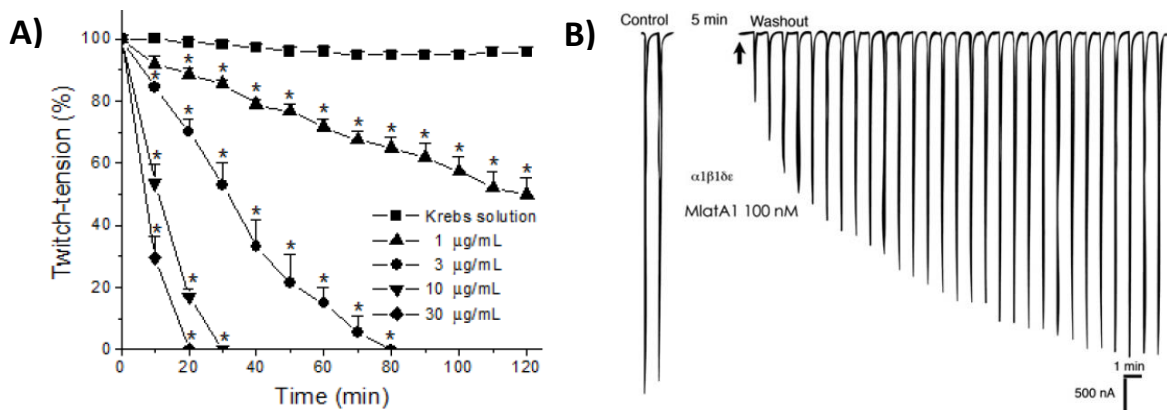


Figura 7. A) Bloqueo neuromuscular causado por el veneno de *M. laticollaris* (1, 3, 10 y 30 µg/mL) en preparaciones de músculo “biventer cervicis”. **B)** Lenta disociación de MlatA1 aplicada en oocitos de *X. laevis* (concentración= 100 nM) expresando un receptor nACh del subtipo adulto ($\alpha\beta\epsilon\delta$) en un baño estático, la flecha (\uparrow) indica la primera corriente de elución después de 5 minutos de equilibrio de la toxina. Tomado y modificado de Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013 y Carbajal-Saucedo *et al.*, 2014.

Carbajal-Saucedo (2014) demostró la neutralización del veneno completo y las PLA₂ letales de *M. laticollaris* usando un suero anti-*M. laticollaris*, producido en caballo, sin embargo, la α -neurotoxina MlatA1 no fue neutralizada con el suero producido en caballo ni con un suero producido en conejo que tenía como inmunógeno únicamente la toxina pura. El suero de caballo anti-*M. laticollaris* mostró buena neutralización de los venenos de *M. browni*, *M. diastema*, *M. distans* y *M. ephippifer*, teniendo una mayor neutralización que la observada con el veneno de la especie homóloga. Los venenos de *M. f. fulvius* y *M. nigrocinctus* fueron neutralizados, aunque en menor proporción que el veneno de *M. laticollaris*. En cambio, los venenos de *M. latifasciatus*, *M. limbatus* y *M. tener* no fueron neutralizados con este suero (Bénard-Valle, 2010; Carbajal-Saucedo, 2014).

Se cuenta con una caracterización del veneno, y algunos de sus principales efectos, de la serpiente de coral del Balsas *M. laticollaris*. Sin embargo, se desconoce si existe variación en los componentes del veneno entre individuos, tanto a nivel poblacional como a lo largo de su distribución. Aunado a esto, existen muy pocos estudios que indaguen en la variación intra-específica del veneno de

las serpientes de coral en el continente. Desde un punto de vista biológico y médico, resulta relevante conocer la variabilidad del veneno de una especie, sobre todo en el caso de un accidente ofídico.

3. Hipótesis

- Existe variación en los componentes del veneno de los individuos de *Micrurus laticollaris* y ésta, a su vez, influye en la neutralización con el antiveneno comercial Coralmy[®].

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Analizar el efecto de la posible variación presente en veneno de *Micrurus laticollaris*, tanto en su letalidad como en su neutralización con el antiveneno comercial Coralmy[®].

4.2. Objetivos específicos

- Determinar si existen diferencias en la composición del veneno de los individuos de *M. laticollaris* de 11 localidades.
- Determinar si existe variación en la letalidad de los venenos.
- Determinar si la variación observada es relevante en la neutralización con el antiveneno comercial Coralmy[®].

5. Materiales y Métodos

5.1. Veneno

Se utilizaron las muestras de veneno de 21 individuos de *Micrurus laticollaris* pertenecientes a 11 localidades de los estados de Morelos (n=10), Guerrero (n=2) y Colima (n=9), colectadas entre los años 2009 y 2019, resguardadas en el banco de venenos del Herpetario Cantil-IBt UNAM (Figura 8).

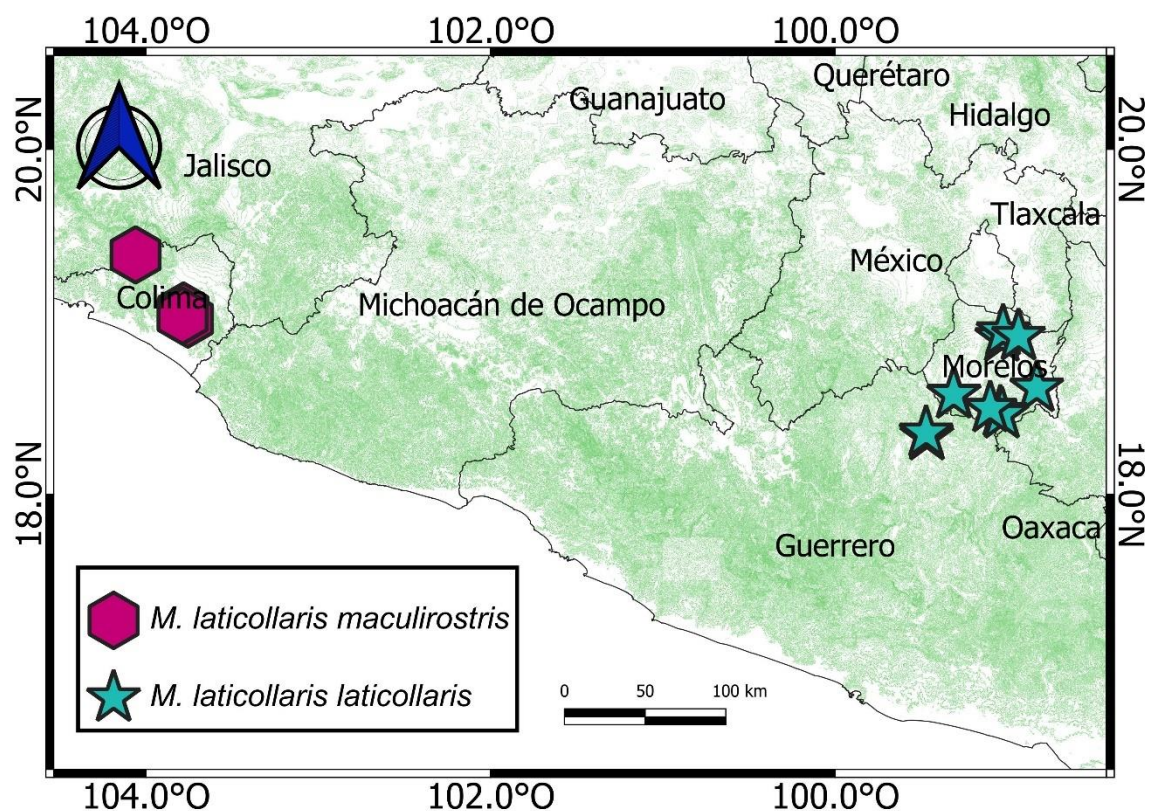


Figura 8. Mapa de distribución de los 21 individuos de *M. laticollaris* que forman parte del presente estudio. Colima n=9, Morelos n=10 y Guerrero n=2. Elaboración personal. Curvas de nivel INEGI 2014. Shapefile INEGI 2019.

Tomando en cuenta la distribución reportada por Roze (1996) para las subespecies de *M. laticollaris*, los individuos de Morelos y Guerrero fueron identificados como parte de *M. laticollaris laticollaris*, mientras que los de Colima se identificaron como *M. laticollaris maculirostris*. Se utilizó una sola extracción de veneno por individuo y los venenos fueron resuspendidos en acetato de amonio 20

mM pH 4.7. Posteriormente se realizaron 3 mezclas de los venenos, con los individuos del mismo estado, añadiendo la misma cantidad de veneno por individuo (200 µg de veneno por individuo para las mezclas de Colima y Morelos y 500 µg para la mezcla de Guerrero) (Tabla 1). Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 1. Detalle del registro y la cantidad de veneno de los individuos de *M. laticollaris* usados para las mezclas por estado.

<i>Código</i>	<i>Estado</i>	<i>Municipio</i>	<i>Cantidad de veneno (µg)</i>
<i>HK025</i>	Morelos	Yautepec	200
<i>HK026</i>	Morelos	Yautepec	200
<i>HK029</i>	Morelos	Atlatlahucan	200
<i>HK158</i>	Morelos	Tlaquilenango	200
<i>HK179</i>	Morelos	Tlaquilenango	200
<i>HK258</i>	Morelos	Tlaquilenango	200
<i>IBt-022</i>	Morelos	Barranca Honda	200
<i>HK247</i>	Morelos	Desconocido	200
<i>IBt-075</i>	Morelos	Puente de Ixtla	200
<i>IBt-137</i>	Morelos	Puente de Ixtla	200
<i>HK111</i>	Guerrero	Iguala de Independencia	500
<i>IBt-017</i>	Guerrero	Tuxpan	500
<i>HK032</i>	Colima	Tecomán	200
<i>HK034</i>	Colima	Tecomán	200
<i>IBt-005</i>	Colima	Tecomán	200
<i>HK035</i>	Colima	Tecomán	200
<i>HK037</i>	Colima	Tecomán	200
<i>HK043</i>	Colima	Tecomán	200
<i>HK038</i>	Colima	Ixtlahuacán	200
<i>HK047</i>	Colima	Ixtlahuacán	200
<i>HK033</i>	Colima	Carretera a Minatitlán	200

HK: Individuos que anteriormente pertenecían al Herpetario Kiinam.

5.2. Cuantificación de proteínas

5.2.1. Absorbancia 280 nm

La cantidad de proteína presente en cada muestra fue cuantificada en un espectrofotómetro (Eppendorf, Thermo Scientific), usando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. Se midió la absorbancia de las muestras a 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina), asumiendo un coeficiente de extinción igual a 1. Por lo tanto, una unidad de Absorbancia a 280 nm es igual a 1 mg/mL de proteína de veneno por muestra. Este método también fue usado para cuantificar el antiveneno comercial Coralmyn®, lotes B-2H-12 y B-0E-33. Tomando en cuenta que el antiveneno está compuesto por fragmentos $F(ab')_2$, en este caso, se usó el coeficiente de extinción molar reportado para los $F(ab')_2$ de 1.44.

5.2.2. Método del ácido bicinconínico

La cuantificación proteica usando el método del ácido bicinconínico (BCA) se llevó a cabo con un kit comercial (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando albúmina de suero bovino (BSA) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) como estándar. La curva de calibración fue obtenida mediante 5 estándares de albúmina sérica bovina: 20, 40, 80, 160 y 320 µg/ml. Se registró la Absorbancia a 570 nm en un lector Tecan-Sunrise. Los datos fueron analizados en el software Magellan 4.3 (ver protocolo en Anexo 1).

5.3. Geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE)

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de los venenos completos de los 21 individuos, las 3 mezclas de los Estados y las 4 toxinas purificadas, en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). En una matriz de poliacrilamida-bisacrilamida al 15% como gel separador y al 4% como

concentrador, se cargaron 15 μg de veneno completo de los individuos y las mezclas por Estado, en condiciones reductoras (buffer de carga con β -mercaptoetanol 5X e incubadas en agua hirviendo durante 5 min) y no reductoras (buffer de carga sin β -mercaptoetanol y sin tratamiento térmico en agua hirviendo). Se cargaron también 7 μg en condiciones reductoras de las toxinas más relevantes purificadas por RP-HPLC, pertenecientes a cada mezcla por estado. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante inicial de 80 V por 15 minutos, seguido de un aumento a 120 V, por un tiempo aproximado de 90 minutos. La estimación de peso molecular se llevó a cabo incluyendo en cada gel 5 μl de marcadores de peso molecular preteñidos de amplio rango para proteínas (11 a 245 KDa) (RGB Plus- MaestroGen Inc., Taiwan). Los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomassie R-250 y se destiñeron usando una solución con metanol al 10% y ácido acético al 10%.

5.4. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Para obtener los perfiles cromatográficos de los 21 individuos se cargaron 300 μg de veneno por individuo, en una columna C_{18} (Pursuit XRs-C18, 250 mm longitud, 4.6 mm diámetro interno). Los cromatogramas fueron determinados usando absorbancia a 214 y 280 nm. De las mezclas por Estado se cargaron 500 μg de veneno y se recuperaron 4 fracciones de interés para su posterior análisis por electroforesis (SDS-PAGE) y determinación de masas. Las fracciones más abundantes, así como una fracción que coincidía en tiempo de elución con la toxina MlatA1, fueron secadas por centrifugación al vacío en Savant y almacenadas a 4° C hasta su utilización. (Ver Anexo 2).

Los porcentajes de abundancia fueron calculados a partir del área bajo la curva, en el veneno de los 21 individuos, usando las medidas de absorbancia a 214 nm resultantes de los perfiles de RP-HPLC, tomando énfasis en 4 fracciones, denominadas e identificadas como: MlatA1, PLA₂ B, PLA₂ C y PLA₂ D. El

porcentaje de abundancia se calculó de forma manual en el programa Excel versión 2016.

5.5. Determinación de masa molecular por ESI/MS

Las 4 principales fracciones obtenidas por RP-HPLC, de cada mezcla por estado, fueron cargadas en un espectrómetro de masas LCQ-Fleet (Thermo-Fisher) con sistema de ionización por nano-electrospray (ESI). Fueron inyectadas por difusión directa usando 60% de acetonitrilo + 0.1% de ácido acético como fase móvil, con una velocidad de flujo de 10 μ l/minuto. El voltaje de aerosol fue de 2.1 kV y la detección de iones fue realizada en modo positivo. Los datos de la espectrometría fueron obtenidos en el programa Tune Plus, mientras que el programa Xtract fue usado para la deconvolución de los datos. Los resultados de masas fueron determinados por el Dr. Fernando Zamudio Zuñiga en el Instituto de Biotecnología-UNAM.

5.6. Actividad fosfolipasa

La actividad enzimática de tipo fosfolipasa del veneno de los individuos, las mezclas y las 4 fracciones colectadas por RP-HPLC, fue evaluada mediante un ensayo titulométrico con yema de huevo al 10% (Shiloah *et al.*, 1973). Dicho ensayo consiste en ajustar el pH de la solución (0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 0.5% Triton X100) con yema de huevo al 10% a 8.05 con NaOH 50 mM. Posteriormente se agregan diferentes cantidades del veneno o toxina, lo que provoca una disminución del pH debido a la liberación de ácidos grasos por la acción de las PLA₂. Una vez que el pH es de 7.99 se agrega una cantidad variable de NaOH 50 mM y se registra el tiempo tomado con un cronómetro, hasta un total de 6 mediciones de tiempo con 3 repeticiones por muestra. La actividad enzimática es expresada en unidades específicas (U) definidas como μ moles de NaOH consumidas por minuto y se reportan como U/mg de veneno o toxina. (Ver Anexo 3).

5.7. ELISA

El reconocimiento del faboterápico polivalente se realizó mediante Ensayos de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA), usando dos lotes de Coralmy[®] (B-2H-12 y B-0E-33). Las lecturas de absorbancia se hicieron a 405 nm en un lector de microplacas (Tecan-Sunrise). Las placas fueron sensibilizadas con 500 ng/pozo de veneno completo, de la mezcla Colima, por cuadruplicado y las 4 fracciones letales por triplicado, purificadas a partir de la mezcla Colima. Se usó una concentración inicial de 500 µg/mL de Coralmy[®] con diluciones seriadas 1:3. El título de cada antiveneno, contra el veneno y las toxinas, fue definido como la concentración de antiveneno a la que se alcanza la mitad de la absorbancia máxima, calculado en el programa Prism versión 8.4.3 (GraphPad Software, Inc). (Ver Anexo 4).

5.8. Letalidades

La dosis letal media (DL_{50}), entendida como la cantidad de veneno o toxina que mata al 50% de una población, se determinó en ratones de la cepa CD-1 de entre 18 y 20 gramos de peso corporal para las mezclas de los 3 estados, 3 fracciones letales y un individuo de Colima con número de registro IBt-005. Debido al bajo porcentaje de abundancia de la toxina MlatA1, se tomó la dosis letal reportada por Carbajal-Saucedo (2014). En grupos de tres ratones se inyectaron diferentes cantidades, por vía intravenosa, del veneno completo y las fracciones purificadas por RP-HPLC. Los datos obtenidos 24 horas después de la inyección se graficaron usando el porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la cantidad de veneno inoculado (Casasola *et al.*, 2009). Se analizaron mediante una regresión no lineal con una curva sigmoide de dosis-respuesta en el programa Prism versión 8.4.3 (GraphPad Software, Inc).

5.9. Neutralización con antiveneno

Para determinar la potencia neutralizante del antiveneno comercial Coralmy[®], se utilizaron dos lotes: B-2H-12 y B-0E-33, con una concentración promedio de 6.8 mg/ml y 10.5 mg/ml respectivamente. Se obtuvo la Dosis Efectiva Media (DE₅₀), entendida como la cantidad de antiveneno necesaria para salvar al 50% de una población de ratones. Incubando por 30 minutos, a 37 °C, distintas cantidades del antiveneno con 1.5 a 12 DL₅₀ de las muestras de veneno (mezclas por estado, individuo IBt-005 y las 4 toxinas purificadas), con un volumen final de 500 µl en PBS 1X.

Las mezclas de veneno y antiveneno fueron inyectadas por vía intravenosa (*i.v.*) en ratones de la cepa CD-1 de entre 18 y 20 gramos de peso corporal. Los datos de supervivencia se tomaron 24 horas después de la inyección. En el programa Prism versión 8.4.3 se graficó el porcentaje de supervivencia en función del logaritmo de la cantidad de antiveneno inoculado y se calculó la DE₅₀ con una regresión no lineal de una curva sigmoide dosis-respuesta (Casasola *et al.*, 2009).

5.9.1. Coralmy[®] lote B-2H-12

Debido a la baja proporción de 3FTxs en el veneno, para evaluar la posible implicación de dichas toxinas en un envenenamiento real, se incubaron 12 DL₅₀s de veneno de las 3 mezclas por estado, así como del individuo IBt-005 que carece de MlatA1, contra cantidades variables de antiveneno para determinar la dosis efectiva media. Las 4 toxinas letales (MlatA1 y las PLA₂ B, C y D), purificadas por RP-HPLC, fueron retadas con 3 DL₅₀s contra cantidades variables de antiveneno para determinar la dosis efectiva media. Adicionalmente se evaluó la neutralización de MlatA1 con 1.5 DL₅₀s. Concentraciones por vial: 7.2 y 6.4 mg/ml.

5.9.2. Coralmy[®] lote B-0E-33

Estudios previos en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, demostraron mayor capacidad de reconocimiento y neutralización, hacia 3FTxs con este lote, que las obtenidas con el lote B-2H-12 (Neri-Castro, datos no publicados). Debido a que se contaba con pocos viales del lote B-0E-33 de Coralmy[®], únicamente la toxina MlatA1 fue retada contra este. Se preincubaron 1.5 y 3 DL₅₀s con cantidades variables de antiveneno para determinar la dosis efectiva media. Concentraciones por vial: 10.7 y 10.3 mg/ml.

6. Resultados

Debido a que la variación en la composición del veneno se analizó de manera individual y por mezclas, esta sección se divide en dos partes:

- 1) Variación individual.
- 2) Variación y neutralización de las mezclas por estado y fracciones letales purificadas.

6.1. Primera parte: Variación individual del veneno de *Micrurus laticollaris*

6.1.1. Geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida de los 21 individuos en condiciones reductoras (Figura 9, izquierda) muestran una o dos bandas muy abundantes entre 11 y 17 KDa. Sin embargo, hay marcadas diferencias en las bandas debajo de los 11 KDa llegando a estar casi ausentes en los individuos HK037, HK043 e IBt-005 pertenecientes al municipio de Tecomán, del estado de Colima, así como en los individuos HK179 e IBt-006, de Morelos y Guerrero respectivamente. En los geles no reductores (Figura 9, derecha) se aprecian muchas bandas de entre los 11 y los 35 KDa, para los individuos de Morelos y Guerrero, con unas tenues bandas

cercanas a los 48 KDa. En los individuos de Colima, las bandas de los geles no reductoros se encuentran entre los 11 y los 25 KDa siendo poco notorias las bandas cercanas a 48 KDa.

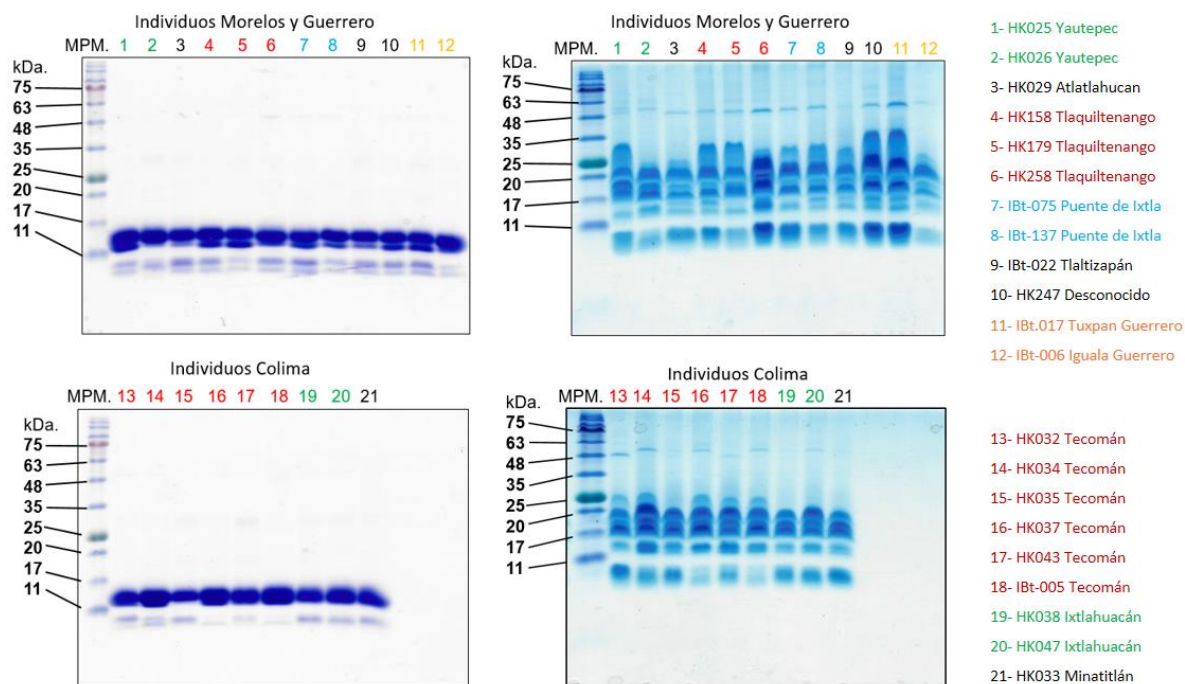


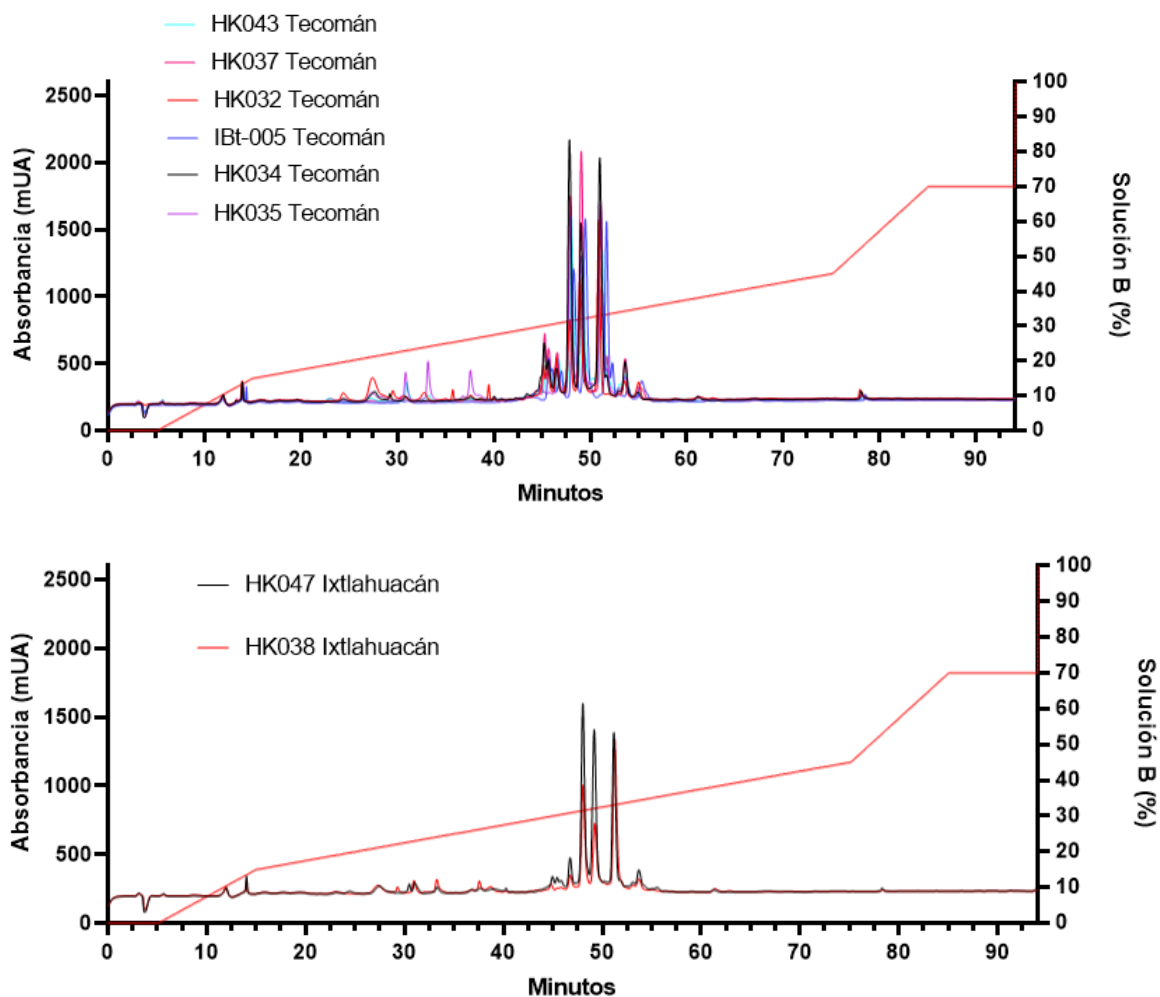
Figura 9. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en SDS. **Izquierda:** Condiciones reductoras. **Derecha:** condiciones no reductoras. **MPM:** Marcador de peso molecular. 15 μ g de veneno completo por carril. Los colores de los números representan individuos de la misma localidad. Se indican en negro los individuos con localidades únicas.

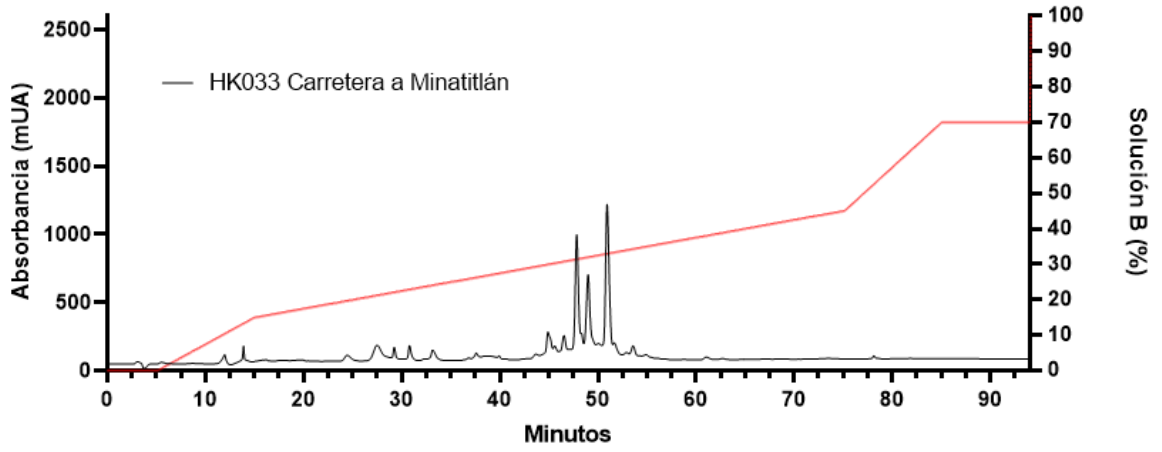
6.1.2. Porcentaje de abundancia de las fracciones

Se compararon los perfiles obtenidos por cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC), con absorbancia a 214 nm, de los 21 individuos, sobreponiendo aquellos pertenecientes a las mismas localidades (Figura 10). Se observa un patrón general, pudiendo reconocerse la mayoría de las fracciones en tiempos de elución similares, sin embargo, estas varían ampliamente en abundancia entre individuos, aún dentro de aquellos que pertenecen a la misma localidad. Esto sugiere que la variación del veneno es individual, dentro de las dos

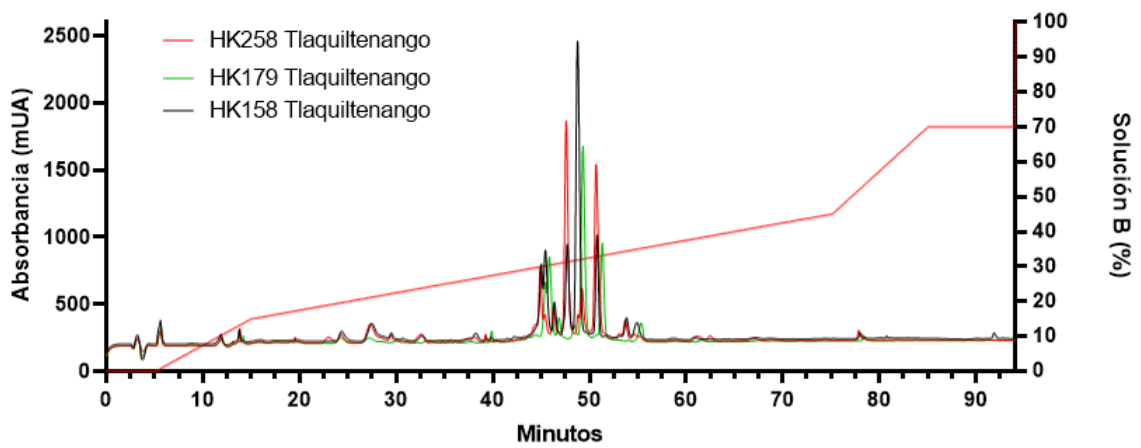
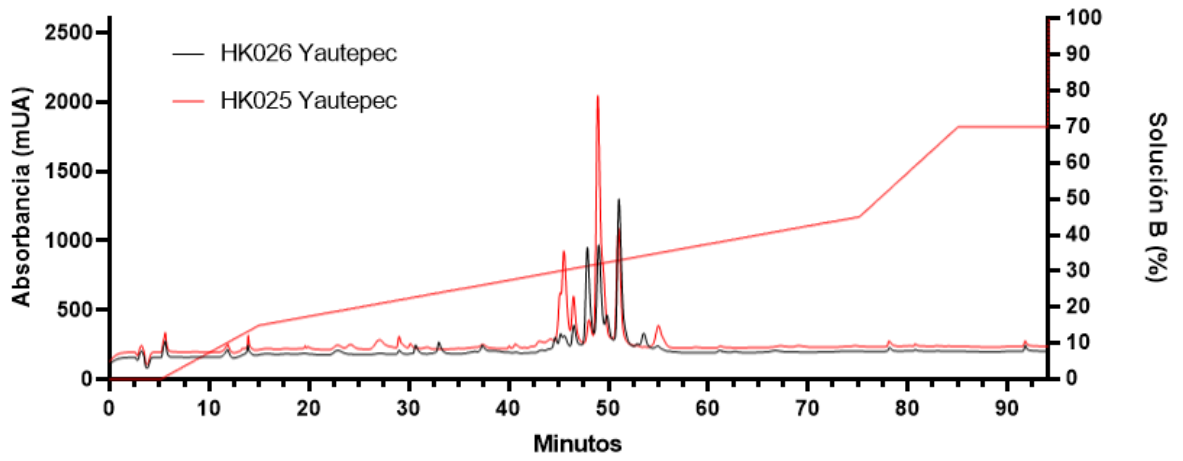
subespecies, y no se debe a la distribución geográfica. Con la finalidad de llevar a cabo una revisión detallada, se calculó el área bajo la curva de todas las fracciones del veneno, con especial énfasis en 4 fracciones de interés que representan, en menor o mayor medida, los componentes más abundantes del veneno en todos los individuos y se sospecha juegan un papel preponderante en la letalidad total del veneno.

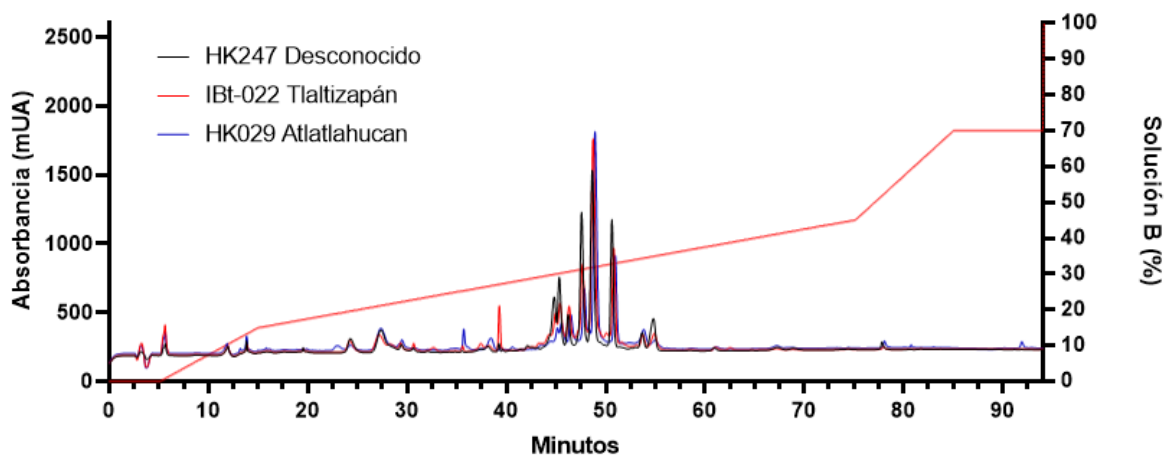
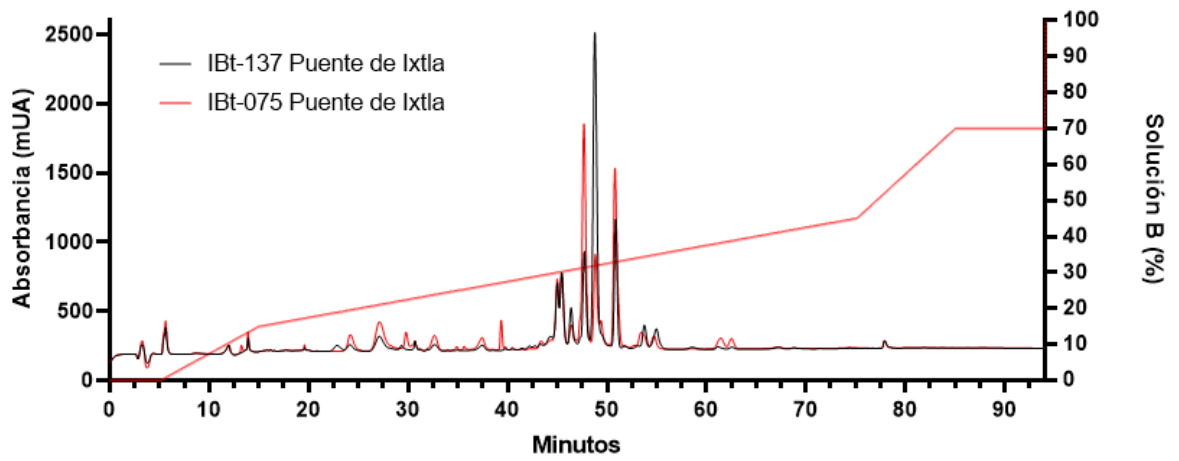
A)





B)





C)

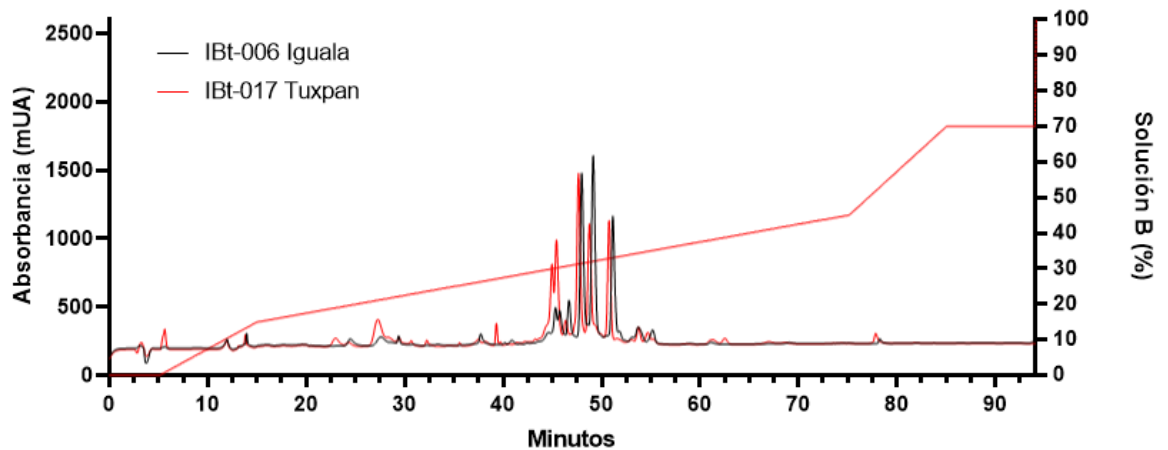


Figura 10. Perfiles cromatográficos (A_{214}) de los individuos de *M. laticollaris* pertenecientes a **A)** Colima, **B)** Morelos y **C)** Guerrero. 300 μg de veneno por individuo.

Usando los porcentajes de abundancia para las 4 toxinas, calculados a partir del área bajo la curva de los perfiles cromatográficos con absorbancia a 214 nm (Tabla 2), se construyó un mapa de calor, con el propósito de visualizarlos de manera gráfica (Figura 11).

Tabla 2. Porcentaje de abundancia de las 4 principales fracciones letales de *M. laticollaris* en los 21 individuos analizados.

Individuo	% MlatA1	% PLA ₂ B	% PLA ₂ C	% PLA ₂ D	Estado	Municipio
IBt-005	0.0	16.5	21.7	17.2	Colima	Tecomán
HK032 (IBt-003)	7.9	8.7	13.9	17.5	Colima	Tecomán
HK034 (IBt-004)	2.1	21.7	14.6	22.9	Colima	Tecomán
HK035	1.8	17.2	13.9	18.5	Colima	Tecomán
HK037	0.2	17.7	23.8	15.4	Colima	Tecomán
HK043	1.1	19.8	16.5	14.3	Colima	Tecomán
HK038	3.0	14.3	10.0	22.0	Colima	Ixtlahuacán
HK047	2.3	18.2	16.4	14.4	Colima	Ixtlahuacán
HK033	5.1	14.6	12.5	21.3	Colima	Carr. Minatitlán
HK025	2.4	2.2	30.8	12.3	Morelos	Yautepec
HK026	0.3	12.3	12.8	21.2	Morelos	Yautepec
HK158	4.2	7.8	25.7	6.8	Morelos	Tlaquilténango
HK179	1.7	1.6	24.8	11.7	Morelos	Tlaquilténango
HK258	5.2	19.7	4.9	19.8	Morelos	Tlaquilténango
IBt-075	6.6	18.0	6.9	14.9	Morelos	Puente de Ixtla
IBt-137	3.4	7.6	29.0	8.7	Morelos	Puente de Ixtla
HK029	5.5	5.4	23.4	7.8	Morelos	Atlátlahuacán
IBt-022	4.1	7.6	22.4	8.2	Morelos	Tlaltizapán
HK247	6.2	12.3	17.6	10.0	Morelos	D
HK111 (IBt-006)	2.2	16.2	19.7	12.4	Guerrero	Iguala de la Independencia
IBt-017	5.9	15.0	11.8	9.5	Guerrero	Tuxpan

Porcentajes calculados a partir de la absorbancia a 214 nm. Colima n=9, Morelos n=10 y Guerrero n=2. **D:** localidad desconocida. En rojo se indican los individuos con porcentajes de MlatA1 cercanos a 0.

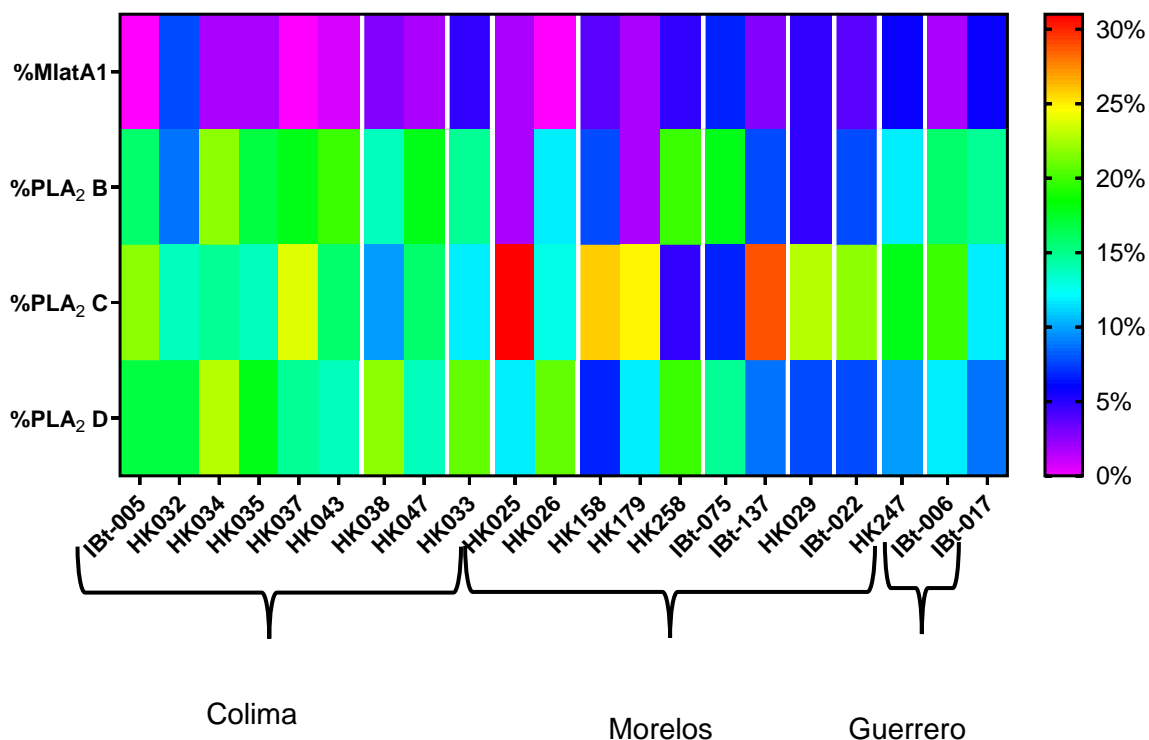


Figura 11. Mapa de calor ilustrando el porcentaje de abundancia de las principales fracciones letales en los individuos de *M. laticollaris*. El patrón de abundancia de toxinas de los individuos de Colima difiere de Morelos y Guerrero. Las barras en blanco delimitan los individuos de las mismas localidades.

Al menos 3 individuos, IBt-005 y HK037 del municipio de Tecomán, Colima y HK026 del municipio de Yautepec, Morelos, presentan un porcentaje de abundancia cercano al 0% de la α -neurotoxina MlatA1, la cual alcanza, por el contrario, los mayores porcentajes en los individuos HK032 de Tecomán, Colima (7.9%) e IBt-075, de Puente de Ixtla, Morelos (6.6%).

La PLA₂ B representa entre el 1.6% y el 21.7% del veneno total entre los organismos analizados, siendo el individuo HK179 de Tlaquiltenango, Morelos, el que presenta el menor porcentaje y el HK034 perteneciente a Tecomán, Colima, el que muestra el porcentaje más alto. La PLA₂ C, alcanza los mayores porcentajes (\approx 30%), en el veneno de los individuos HK025 e IBt-137 de Morelos, no obstante, en los individuos HK258 de Tlaquiltenango, Morelos e IBt-075, de Puente de Ixtla,

Morelos, representa únicamente el 4.9 y 6.9% respectivamente. La PLA₂ D muestra porcentajes de abundancia que oscilan entre el 6.8%, en el individuo HK158, de Tlaquiltenango, Morelos y el 22.9% del individuo HK034 de Tecomán, Colima. La heterogeneidad denotada en la abundancia relativa de las 4 toxinas sugiere que, la letalidad y la neutralización del veneno entre los individuos podría ser variable.

6.1.3. Actividad enzimática de tipo PLA₂

Como parte de la caracterización bioquímica para comparar el veneno de los individuos, se obtuvo su actividad enzimática de tipo PLA₂ en yema de huevo al 10%, un substrato muy rico en fosfolípidos. El ensayo muestra amplia variación, desde 104.7 U/mg en el individuo HK038 de Ixtlahuacán, Colima, hasta 369.6 U/mg en el individuo IBt-005 de Tecomán, Colima (Figura 12).

Si bien, las PLA₂ de tipo β -neurotoxinas, necesitan ser enzimáticamente activas para llevar a cabo su actividad catalítica en los botones presinápticos, no se ha encontrado una correlación entre la letalidad y el valor medido en la actividad enzimática (Gutiérrez y Lomonte, 2013).

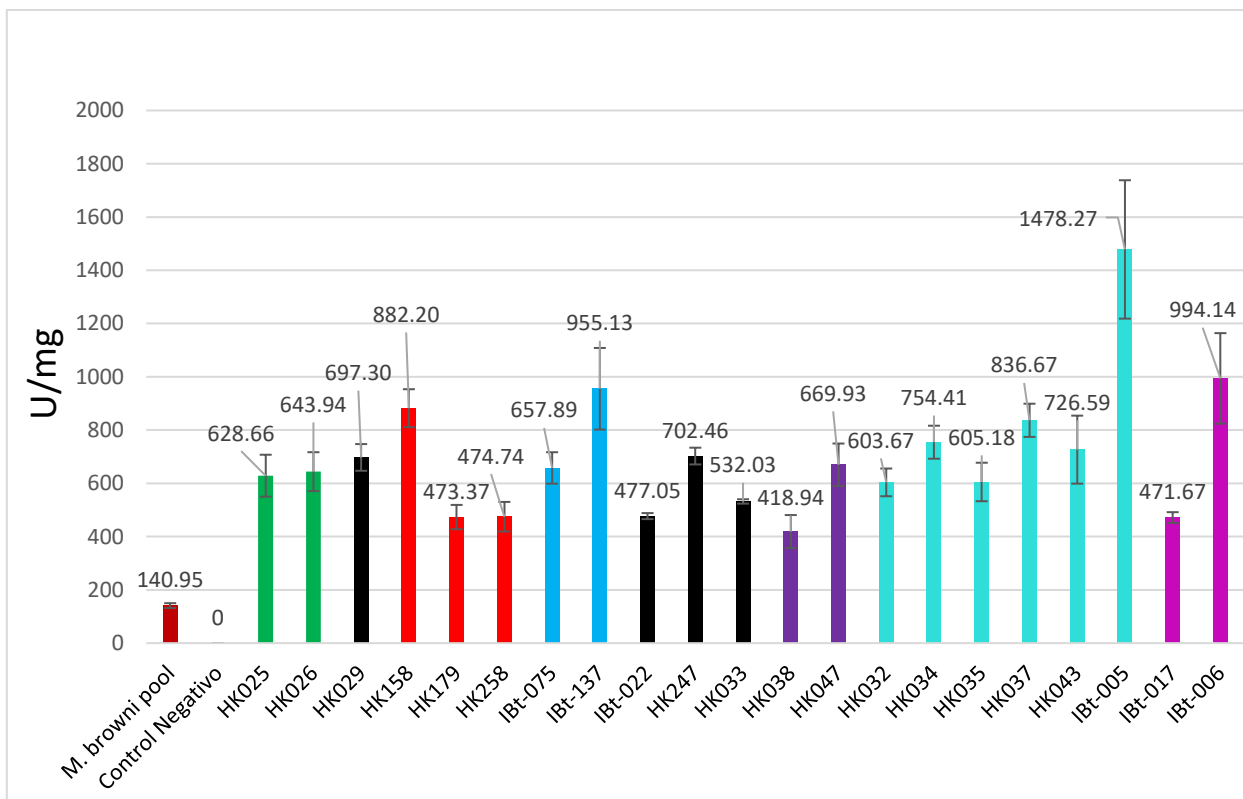


Figura 12. Actividad PLA₂ de los individuos de *M. laticollaris*. Ensayo titulométrico en yema de huevo al 10%. **U/mg:** μ molas de NaOH consumidas por minuto por miligramo de veneno. Las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones. Se muestran en negro los individuos con localidades únicas. El veneno de *M. browni* fue usado como comparativo. **Control negativo:** agua destilada.

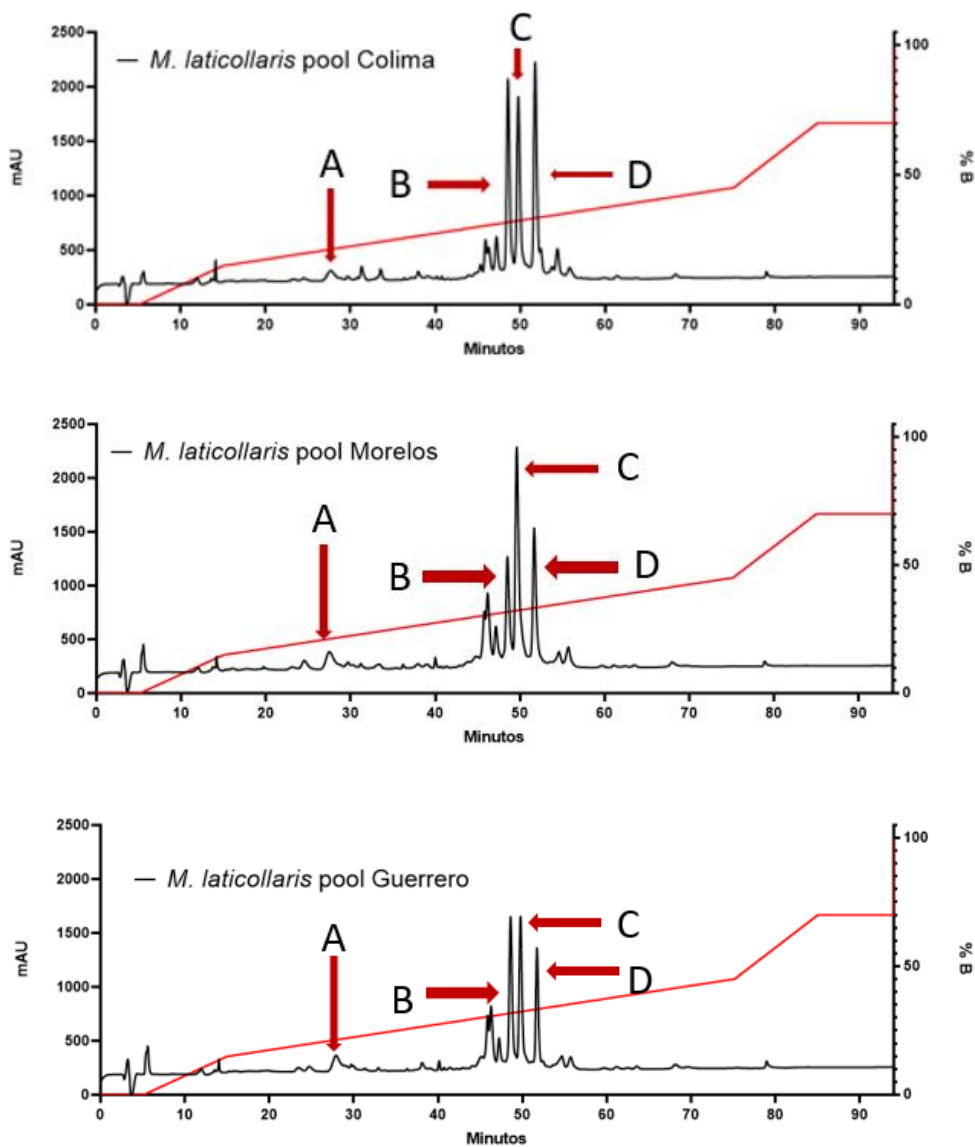
6.2. Segunda parte: letalidad y neutralización de las mezclas por Estado y las fracciones purificadas.

6.2.1. Purificación e identificación de fracciones por Estado

A partir de los perfiles cromatográficos (A₂₁₄) de las 3 mezclas correspondientes a los estados, se purificaron e identificaron 4 fracciones marcadas como: A (MlatA1), B (PLA₂ B), C (PLA₂ C) y D (PLA₂ D) (Figura 13A). A partir de estos cromatogramas, se determinó el porcentaje de abundancia de las 4 fracciones en las tres mezclas (Figura 13B). Posteriormente se verificó que las 4

fracciones, purificadas de cada mezcla, fueran coincidentes mediante los perfiles electroforéticos en SDS, así como por sus masas, determinadas mediante espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) (Figura 13B), únicamente la masa de la fracción D, de la mezcla Morelos, no pudo ser obtenida, probablemente debido a que la proteína no se ionizó correctamente.

A)



B)

Mezcla	% MlatA1	Masa MlatA1	% PLA ₂ B	Masa PLA ₂ B	% PLA ₂ C	Masa PLA ₂ C	% PLA ₂ D	Masa PLA ₂ D
Morelos	3.9	6674.15	9.8	13343.23	22.5	13408.81	12.3	ND
Colima	2.7	6674.34	17.2	13346.70	18.1	13406.80	19.7	13317.82
Guerrero	4.0	6674.76	16.2	13347.40	16.1	13408.79	11.3	13319.90

Figura 13. A) Fracciones analizadas, correspondientes a los perfiles cromatográficos de las mezclas por Estado, absorbancia 214 nm. **B)** porcentaje de abundancia y masas de las 4 fracciones en las mezclas Morelos, Colima y Guerrero. 500 µg por muestra. **Masa:** Masa molecular de las fracciones por Estado determinada mediante ESI/MS. **ND:** masa no determinada.

Los geles de poliacrilamida mostraron un patrón de migración consistente (Figura 14): la fracción A, cuya masa molecular, determinada por ESI-MS y tiempo de retención en RP-HPLC, coinciden con MlatA1 (por lo tanto, de aquí en adelante se le llamará así), presentó un patrón de migración por debajo de los 11 KDa, lo esperado para las toxinas de tres dedos; ninguna de las “fracciones A” presentó contaminación. Las fracciones B, C y D presentaron un patrón de migración en gel entre los 11 y los 17 KDa y su masa, determinada por ESI-MS, fue consistente con la reportada para PLA₂ (de aquí en adelante nombradas como PLA₂ B, C y D). La fracción B de las mezclas Morelos y Guerrero presenta una banda tenue, superior a los 25 KDa, que podría corresponder a alguna metaloproteasa o a proteínas diméricas, en el caso de la mezcla Colima, las tres fracciones presentaron una contaminación similar.

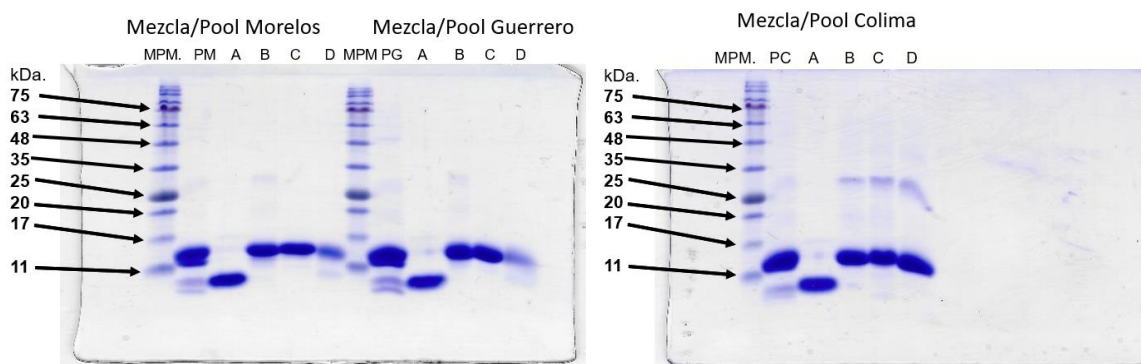


Figura 14. Geles de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras, pertenecientes a las fracciones obtenidas por RP-HPLC de las mezclas por estado. **MPM:** marcador de peso molecular. **PM:** pool o mezcla Morelos. **PG:** pool o mezcla Guerrero. **PC:** pool o mezcla Colima. **A:** fracción A o MlatA1. **B:** fracción B o PLA₂ B. **C:** fracción C o PLA₂ C. **D:** fracción D o PLA₂ D. Se cargaron 15 µg de veneno completo por mezcla de estado y 7 µg de cada fracción.

6.2.2. Actividad enzimática de las fracciones purificadas de las mezclas por estado.

Mediante el ensayo titulométrico en yema de huevo al 10%, se determinó la actividad enzimática de tipo PLA₂ de las 4 fracciones purificadas por estado. Las 3 fracciones de tipo PLA₂ presentan una actividad enzimática muy parecida entre ellas, aunque notoriamente mayor al control de *M. browni*. La toxina de tres dedos, MlatA1, no presentó actividad enzimática, por lo tanto, no se muestra en la gráfica (Figura 15).

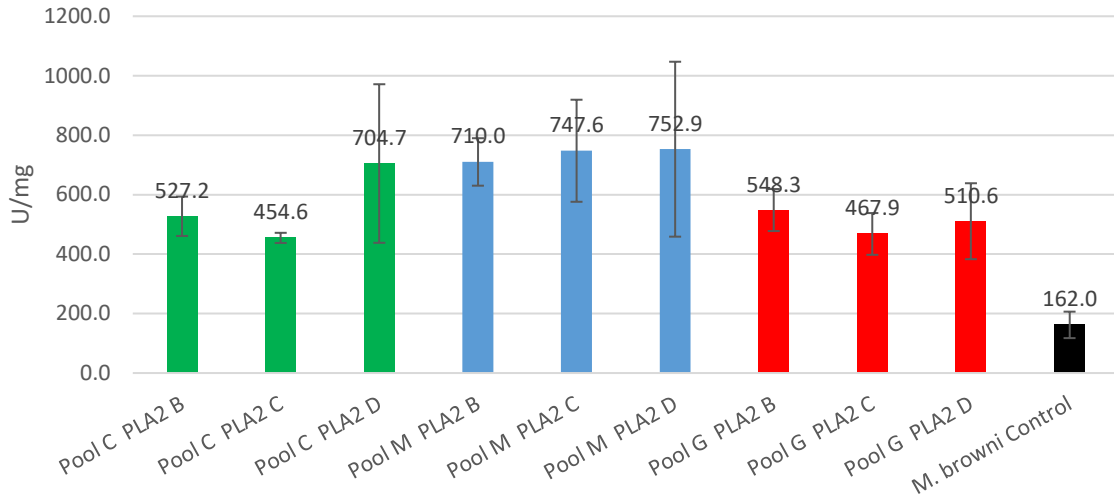
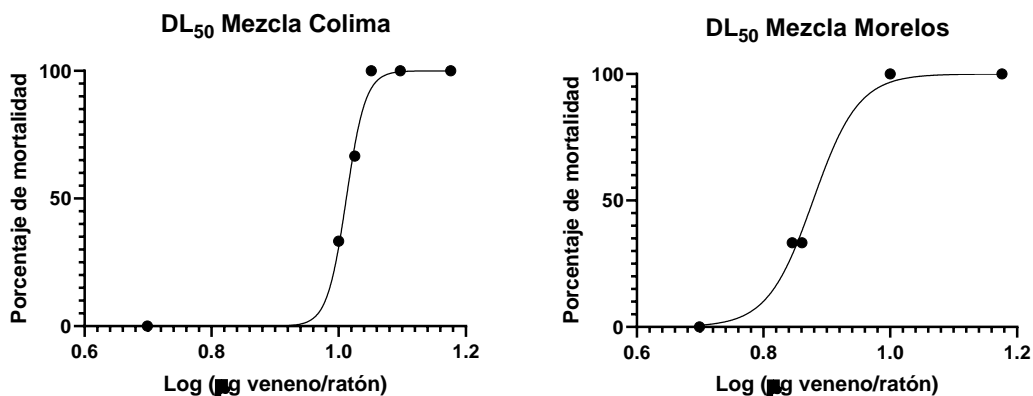


Figura 15. Actividad enzimática de las PLA₂ B, C y D, purificadas a partir de las 3 mezclas por estado mediante el ensayo titulométrico en yema de huevo al 10%. **U/mg:** μmol de NaOH consumidas por minuto por miligramo de veneno. Las barras de error indican desviación estándar de tres repeticiones. Se utilizó el veneno de *M. browni*, como control de referencia, debido a que su actividad enzimática ha sido ampliamente estudiada por Bénard-Valle *et al.*, 2020.

6.2.3. Análisis de letalidad

Primero se evaluó la letalidad de las 3 mezclas por vía intravenosa (*i.v.*) en ratones CD-1. La mezcla Morelos presentó la mayor letalidad con una DL₅₀ de 7.6 μg/ratón (Figura 16), seguida de la mezcla Guerrero con 9.5 μg/ratón, siendo la mezcla Colima la que presentó menor letalidad, con una DL₅₀ de 10.3 μg/ratón.



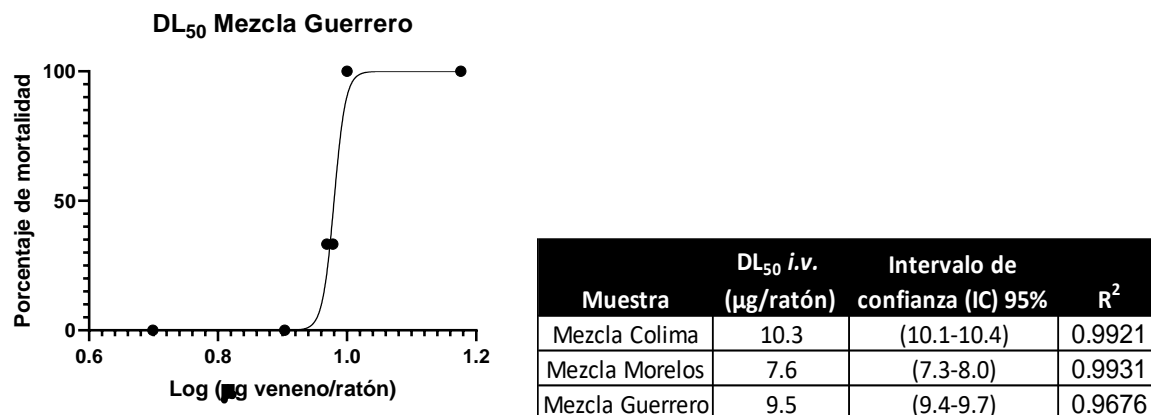


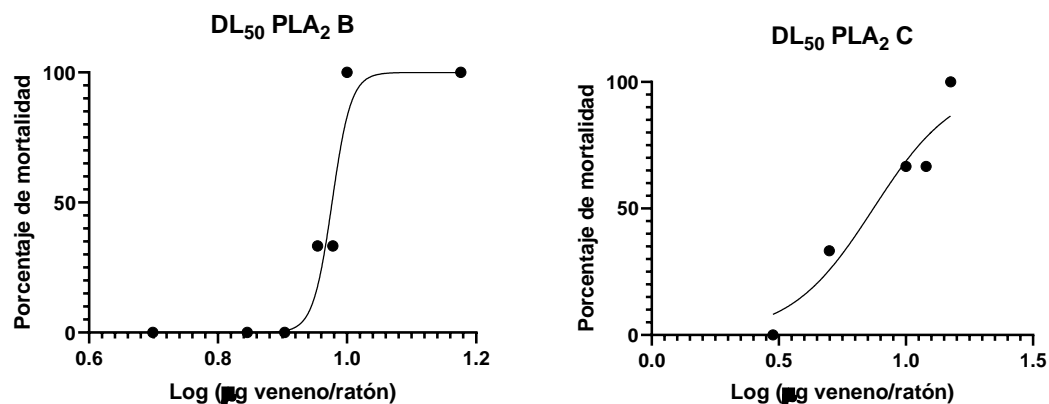
Figura 16. Determinación de DL₅₀ del veneno completo de las 3 mezclas por estado de *M. laticollaris*. DL₅₀ (µg/ratón): Dosis letal media expresada en microgramos inyectados por ratón. *I.V.*: administración del veneno por vía intravenosa. R²: ajuste al modelo de regresión no lineal (curva sigmoide).

Todos los ratones, inyectados con cantidades cercanas o superiores a 1 DL₅₀, presentaron los síntomas del envenenamiento reportados por Carbajal-Saucedo (2014), los cuáles se caracterizan por una parálisis flácida progresiva, sin aparente dolor ni piloerección, hasta que la dificultad para respirar se hace evidente con un rápido movimiento de los músculos intercostales, la muerte subvenía después de 15 minutos en los individuos que presentaban la dificultad para respirar. Los individuos inyectados con las dosis más altas de veneno (15 µg/ratón) presentaban sangrado nasal y bucal, en algunos incluso se detectó orina color rojo. Estas observaciones son consistentes con las reportadas por Carbajal-Saucedo (2014), aunque dicho autor explica que no pudo determinar si la orina roja contenía hemoglobina, mioglobina o ambas. Sin embargo, aquellos individuos que recibieron una cantidad menor a la requerida para ser letal desarrollaban la parálisis generalizada sin llegar a interferir con su respiración y se recuperaban sin daños aparentes al cabo de unas horas.

Una vez determinada la letalidad de las mezclas por estado, se obtuvo la letalidad de las 3 fracciones de tipo PLA₂ por vía intravenosa, purificadas a partir de una mezcla de individuos de Morelos ya que se contaba con suficiente veneno

para la purificación de fracciones, aunado a que tanto la masa molecular como la actividad fosfolipasa fue consistente entre las fracciones de las mezclas por estado. Además, después de la purificación, se corroboró mediante espectrometría de masas, que se tratara de las mismas proteínas (estas se utilizaron también en las pruebas de neutralización). Únicamente la letalidad de la α -neurotoxina MlatA1 fue tomada del trabajo de Carbajal-Saucedo (2014), debido a su bajo porcentaje en el veneno.

Las tres toxinas presentaron una DL_{50} parecida a la letalidad del veneno completo (Figura 17), siendo la PLA_2 C la de mayor letalidad con 7.4 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, seguida de la PLA_2 D con una DL_{50} de 8.4 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, mientras que la menos letal fue la PLA_2 B con 9.5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Sin embargo, estas diferencias no parecen ser significativas, puesto que los intervalos de confianza calculados para las 3 mezclas se sobrelapan. Se observó además que los ratones inyectados con las PLA_2 C y D presentaban sangrado nasal y bucal, tal efecto no fue observado en aquellos individuos inyectados con la PLA_2 B con las cantidades inoculadas. Es posible que el sangrado se deba al daño mecánico provocado por el esfuerzo que realizan los individuos para respirar. Resulta pertinente recordar que, Carbajal-Saucedo (2014) encontró en cortes histológicos, que el veneno completo y algunas fracciones de tipo PLA_2 de *M. laticollaris* pueden causar daño en diferentes tejidos como corazón, pulmón, hígado y riñón.



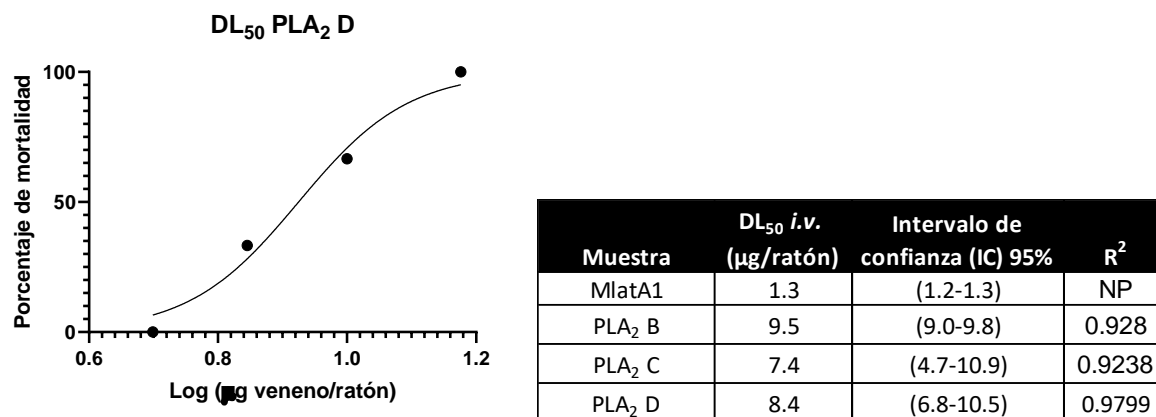
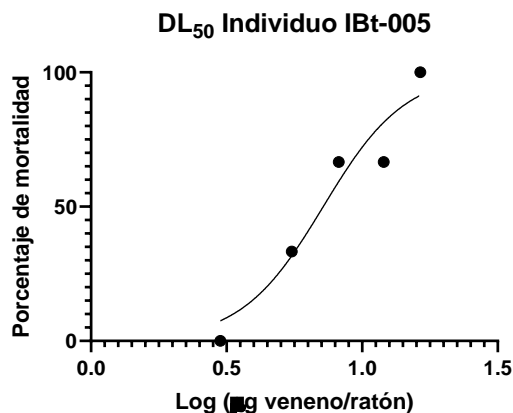


Figura 17. Determinación de la DL₅₀ de las 4 toxinas purificadas de *M. laticollaris*. **DL₅₀ (µg/ratón):** Dosis letal media expresada en microgramos inyectados por ratón. **I.V.:** administración del veneno por vía intravenosa. **MlatA1:** DL₅₀ tomada de Carbajal-Saucedo 2014. **NP:** no presentada por el autor. **R²:** ajuste al modelo de regresión no lineal (curva sigmoide).

Finalmente se evaluó la letalidad de un individuo perteneciente al municipio de Tecomán, Colima, con número de registro IBt-005, debido a que presentó un porcentaje de MlatA1 en el veneno completo del 0% (Tabla 2 y Figura 11). Con la finalidad de comparar si la letalidad, y la neutralización, se veían afectadas al no presentar la α -neurotoxina MlatA1 descrita por Carbajal-Saucedo *et al.*, (2013).

La letalidad del individuo IBt-005 es de 7.2 µg/ratón (Figura 18), siendo muy similar a la encontrada en la mezcla Morelos. Esto sugiere que las PLA₂ son las principales responsables de la toxicidad de esta especie, debido a su alto porcentaje en el veneno.



Muestra	DL ₅₀ <i>i.v.</i> (µg/ratón)	Intervalo de confianza (IC) 95%	R ²
IBt-005	7.2	(4.9-10.2)	0.9304

Figura 18. Determinación de la DL₅₀ del individuo IBt-005 de Tecomán, Colima. **DL₅₀ (µg/ratón):** Dosis letal media expresada en microgramos inyectados por ratón. ***I.V.*:** administración del veneno por vía intravenosa. **R²:** ajuste al modelo de regresión no lineal (curva sigmoide).

6.2.4. Reconocimiento y neutralización con Coralmy[®]

Se evaluó el reconocimiento, mediante ensayos de tipo ELISA, hacia dos lotes del antiveneno comercial Coralmy[®], usando el veneno completo y las 4 fracciones letales purificadas de la mezcla de individuos de Colima. Debido a la alta similitud de las toxinas entre las mezclas no se consideró necesario realizar estos ensayos con las mezclas de individuos de Morelos y Guerrero. El “Título” en los ensayos de tipo ELISA presentados se define como la concentración de antiveneno a la cual se alcanza el 50% de la respuesta máxima. Podemos observar entonces que existen diferencias en el reconocimiento de los dos lotes evaluados, ya que un mayor título significa, a su vez, que existe menor proporción de anticuerpos contra las toxinas evaluadas en un determinado lote (Figura 19). El lote B-2H-12 mostró títulos más altos en general, resaltando el obtenido hacia la toxina MlatA1, el cual fue aproximadamente 3 veces mayor que en el lote B-0E-33. Ambos lotes presentan un bajo reconocimiento hacia la α -neurotoxina MlatA1 cuando se les compara con los títulos obtenidos hacia las PLA₂ y el veneno

completo. Estos resultados indican heterogeneidad entre los lotes de Coralmy[®], lo que puede resultar en una capacidad neutralizante variable.

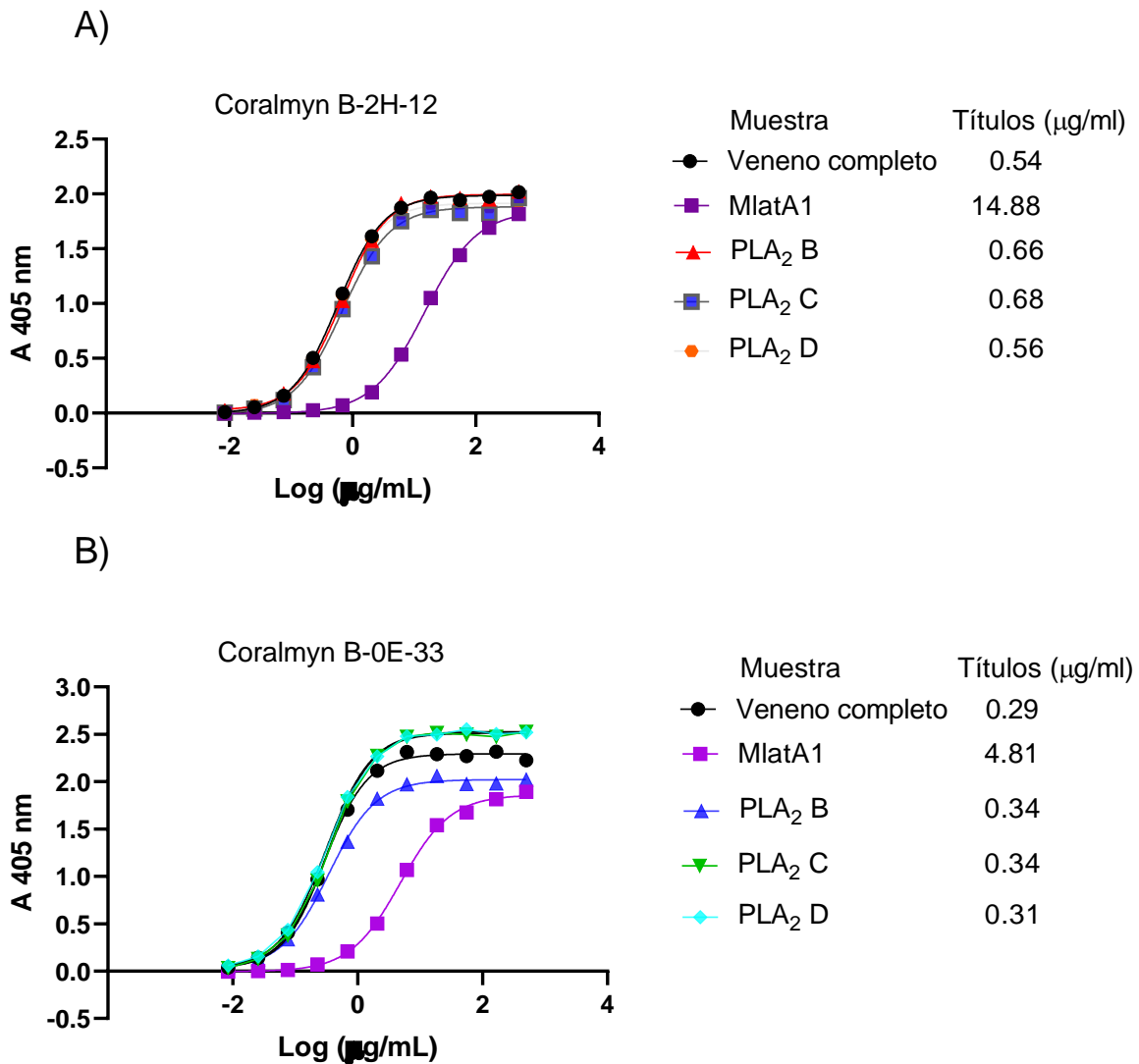
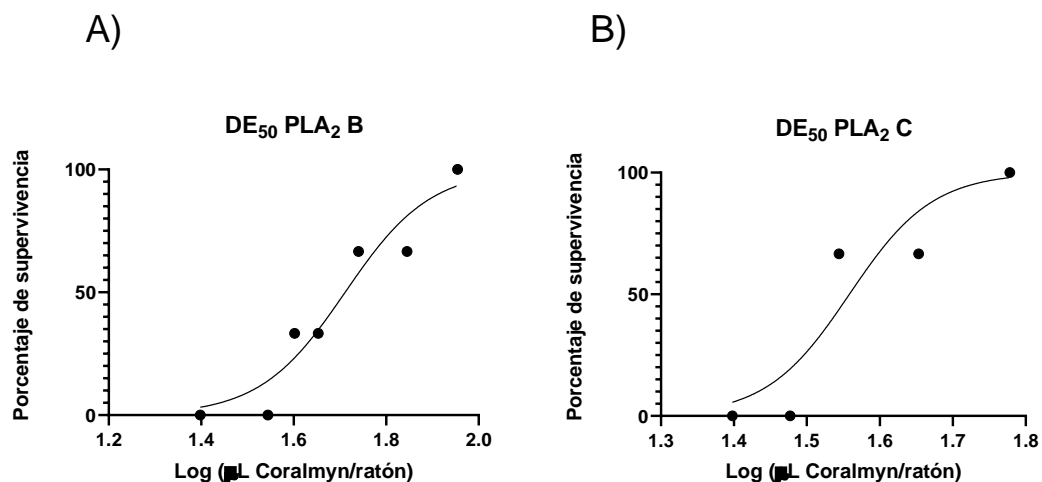
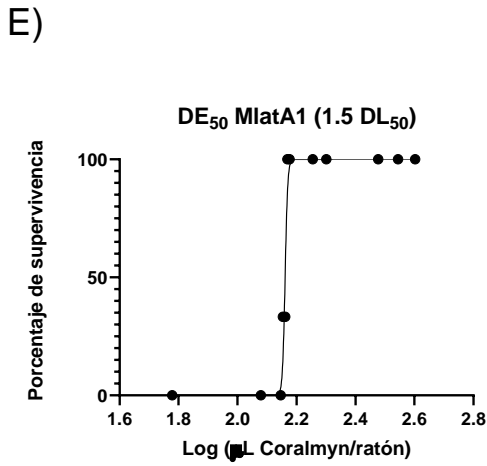
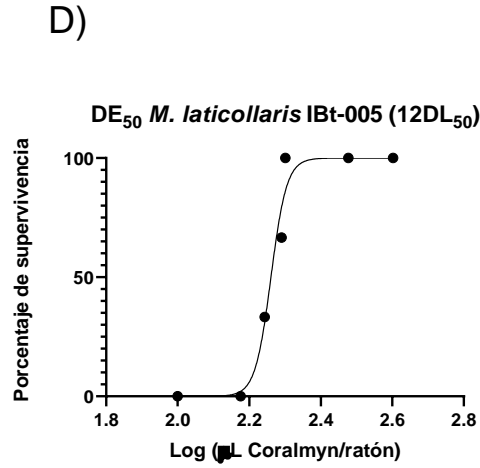
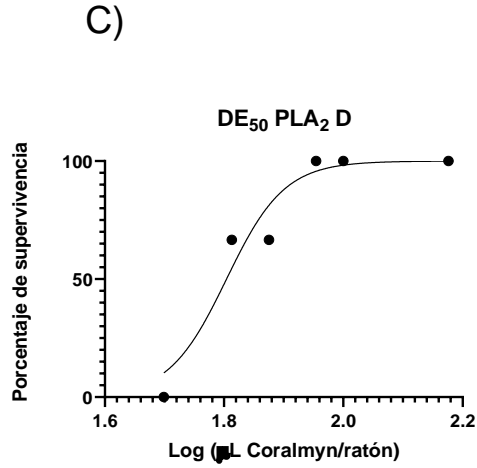


Figura 19. Reconocimiento de Coralmy[®] hacia el veneno completo y las 4 toxinas purificadas de *M. laticollaris* (mezcla Colima) mediante ensayos de tipo ELISA. **A:** Lote B-2H-12. **B:** Lote B-0E-33.

Con el fin de evaluar la capacidad neutralizante del antiveneno *in vivo*, se utilizó el lote B-2H-12 de Coralmy[®] y se determinó la DE₅₀ de las mezclas de los estados en un modelo de ratones envenenados usando 12 DL₅₀s. Con esa cantidad se alcanzan aproximadamente 1.5 DL₅₀s de MlatA1 en el veneno completo, ya que esta toxina se encuentra en bajo porcentaje en las tres mezclas. Utilizando este lote de Coralmy[®], no fue posible neutralizar ninguna de las

mezclas aun usando la cantidad máxima de antiveneno (400 μ l/ratón) (Tabla 3). Posteriormente se determinó la DE₅₀ del antiveneno contra las 4 toxinas purificadas usando 3DL₅₀s de cada una (Figura 20; Tabla 3). No fue posible neutralizar 3 DL₅₀s de MlatA1 con el volumen máximo de Coralmy[®] (400 μ l/ratón) (Tabla 3). Por el contrario, las tres PLA₂ fueron bien neutralizadas con este lote de Coralmy[®] usando 3 DL₅₀s, siendo la PLA₂ D la que presentó la menor capacidad de neutralización con una DE₅₀ de 63.7 μ l/ratón, seguida de la PLA₂ B con 51.4 μ l/ratón y por último la PLA₂ C, fue la mejor neutralizada, con 36.4 μ l/ratón (Figura 20; Tabla 3). Estos resultados sugieren que la muerte de los ratones inyectados con las mezclas de los estados se debe a la escasa neutralización de este lote hacia las toxinas de tres dedos, específicamente hacia MlatA1. Con la finalidad de equiparar la cantidad de MlatA1 inyectada en las mezclas por estado, se probaron diferentes cantidades de antiveneno Coralmy[®], lote B-2H-12, con 3 y 1.5 DL₅₀ de MlatA1, constatando que no había neutralización con un máximo de 400 μ l/ratón (Tabla 3).





F)

Muestra	DE ₅₀ <i>i.v.</i> (µl/ratón)	lote AV	Intervalo de confianza (IC) 95%	R ²
PLA ₂ B	51.4	B-2H-12	(44.7-60.6)	0.9228
PLA ₂ C	36.2	B-2H-12	(27.2-57.9)	0.845
PLA ₂ D	63.7	B-2H-12	(56.4-71.1)	0.936
IBt-005	182.2	B-2H-12	(174.6-189.2)	0.9719
MlatA1	145	B-0E-33	(143.8-146.0)	0.9626

Figura 20. Determinación de la DE₅₀ *i.v.* del antiveneno Coralmylin[®] (lote B-2H-12) contra las PLA₂: **A), B) y C)**; **D)**: contra el individuo IBt-005. **E)**: DE₅₀ de Coralmylin[®] (lote B-0E-33) contra MlatA1. **F)**: detalle de las DE₅₀s calculadas. **DE₅₀ (µl/ratón)**: Dosis efectiva media, expresada en microlitros de antiveneno inyectados por ratón. ***i.v.***: administración del antiveneno por vía intravenosa. **R²**: ajuste al modelo de regresión no lineal (curva sigmoide).

Tabla 3. Comparación de los ensayos de neutralización, de los dos lotes de Coralmy[®], contra las tres mezclas de estado: Morelos, Guerrero y Colima; las 3 PLA₂; el individuo IBt-005 y MlatA1. Las mezclas por estado y el individuo IBt-005 se retaron contra 12 DL₅₀s debido a la baja proporción de MlatA1.

Muestra	DL ₅₀ (µg/ratón)	#DL ₅₀ vs Coralmy [®]	lote de AV	DE ₅₀ (µl/ratón)	Neutralización específica
Mezcla Colima	10.3 (10.1-10.4)	12	B-2H-12	>400	>23.3
Mezcla Morelos	7.6 (7.3-8.0)	12	B-2H-12	>400	>31.6
Mezcla Guerrero	9.5 (9.4-9.7)	12	B-2H-12	>400	>25.3
IBt-005	7.2 (4.9-10.2)	12	B-2H-12	182.2 (174.6-189.2)	13.4
PLA ₂ B	9.5 (9.0-9.8)	3	B-2H-12	51.4 (44.7-60.6)	13.01
PLA ₂ C	7.4 (4.7-10.8)	3	B-2H-12	36.4 (27.2-57.9)	11.8
PLA ₂ D	8.4 (6.8-10.5)	3	B-2H-12	63.7 (56.4-71.1)	18.2
MlatA1	1.3 (1.2-1.3)	3	B-2H-12	>400	>740.2
MlatA1	1.3 (1.2-1.3)	1.5	B-2H-12	>390	>1425.4
MlatA1	1.3 (1.2-1.3)	3	B-0E-33	>400	>1056.4
MlatA1	1.3 (1.2-1.3)	1.5	B-0E-33	145 (143.8-146.0)	818.9

Los paréntesis denotan el intervalo de confianza (IC 95%). **DL₅₀ (µg/ratón):** Dosis letal media expresada en microgramos, de veneno o toxina, inyectados por ratón. **DE₅₀ (µl/ratón):** Dosis efectiva media, expresada en microlitros de antiveneno inyectados por ratón. **Neutralización específica:** miligramos de Coralmy[®] capaces de neutralizar 1 miligramo de toxina o veneno (mg AV/mg toxina). No se utilizaron más de 400 µl de antiveneno en las neutralizaciones ya que, de acuerdo con las directrices de bioética del IBt-UNAM, el volumen máximo inyectable en ratones es de 500 µl.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se retó el veneno del individuo IBt-005 usando 12 DL₅₀, ya que no presentaba MlatA1 en los perfiles cromatográficos. Pese a la alta cantidad de veneno se pudo determinar la DE₅₀, siendo esta de 182.2 µl/ratón (Figura 20; Tabla 3). Este resultado corrobora que las PLA₂ son bien neutralizadas por el lote B-2H-12 de Coralmy[®], a diferencia de MlatA1, y que las diferencias intraespecíficas, en la abundancia de estas toxinas dentro del veneno, son relevantes para la neutralización.

El lote B-0E-33 presentó mejor reconocimiento en ELISA hacia el veneno completo y las 4 toxinas (Figura 19B), por lo cual se evaluó si era capaz de

neutralizar la toxina MlatA1, retándolo contra 3 y 1.5 DL₅₀s. Aunque no fue posible neutralizar 3 DL₅₀s de MlatA1 con un volumen de 390 µl/ratón (Tabla 3), sí fue posible usando 1.5 DL₅₀s de MlatA1, resultando en una DE₅₀ de 145 µl/ratón (Figura 20; Tabla 3).

Con el fin de realizar una comparación clara entre las potencias neutralizantes de ambos lotes de antiveneno, se determinó la neutralización específica, la cual se define como los miligramos de antiveneno que son necesarios para neutralizar 1 miligramo de toxina o veneno (mg AV/mg toxina) (Tabla 3).

7. Discusión

7.1. Variación intraespecífica

Los individuos de *M. laticollaris* presentaron variación en la abundancia de las proteínas analizadas, aunque no parece existir una correlación con la localidad a la cual pertenece cada organismo. Es posible notar diferencias entre el veneno de los *M. laticollaris maculirostris*, pertenecientes al Estado de Colima, ya que las 3 PLA₂ se encontraban en proporciones muy similares entre ellos, a diferencia de *M. laticollaris laticollaris*, de los Estados de Morelos y Guerrero, cuyos patrones mostraban una amplia variación en la abundancia de dichas PLA₂, con porcentajes que oscilaban entre 5 y 30% en el caso específico de la PLA₂ C.

Para el caso de MlatA1, parece haber una mayor abundancia general en los individuos de *M. laticollaris laticollaris*, no obstante, tanto los individuos con el mayor y el menor porcentaje registrado de MlatA1 fueron colectados en Tecomán, Colima y son parte de *M. laticollaris maculirostris*. Además, resulta relevante que en el individuo IBt-005 no fue posible recuperar MlatA1, a partir de muestras de veneno tomadas en diferentes fechas, analizadas mediante cromatografía líquida de fase reversa (Figura 21).

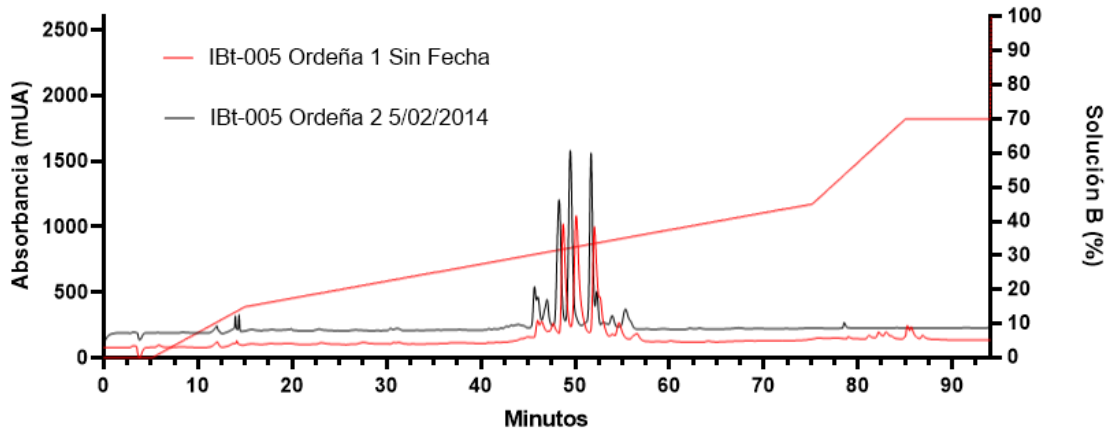


Figura 21. Perfiles obtenidos mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) a partir de dos muestras diferentes de veneno del individuo IBt-005 de Tecomán, Colima. Se utilizaron 300 µg de veneno por fraccionamiento.

No se observó una clara tendencia con respecto a los porcentajes de abundancia de las 4 toxinas analizadas, que en conjunto representan entre el 45 y el 60% del veneno total, y las letalidades obtenidas (DL_{50}) de las mezclas por estado y el individuo IBt-005. Carbajal-Saucedo (2014) reportó la existencia de 6 toxinas letales, equivalentes a cerca del 40% del veneno de *M. laticollaris*, 5 de ellas pertenecientes a la familia de las PLA_2 , todas con una letalidad cercana entre sí (DL_{50} 6.3-7.6 µg/ratón). Tomando esto en cuenta, podemos suponer que las 2 toxinas de tipo PLA_2 no evaluadas en el presente estudio, al representar un bajo porcentaje del veneno, podrían tener un papel menos relevante en el envenenamiento que el mostrado por las PLA_2 analizadas.

Se ha sugerido que la letalidad del veneno, en algunas especies, está sujeta a la acción conjunta o “sinergismo” de diferentes toxinas (Laustsen, 2016; Laustsen *et al.*, 2015), por lo tanto, aunque analizar las toxinas aisladas nos permite conocer a detalle el funcionamiento de éstas, también podríamos subestimar dicho efecto. Tal es el caso del veneno de algunas serpientes de coral norteamericanas como *M. browni*, que posee una toxina multimérica altamente letal, llamada Brownitoxina-1 (DL_{50} *i.v.* <3.8 µg/ratón), formada por una fracción PLA_2 y una fracción 3FTx, aunque aún se desconoce el arreglo específico del

complejo. Se ha observado que Brownitoxina-1 pierde su letalidad al ser fraccionada mediante RP-HPLC, recuperando su potencia letal al unirse las fracciones puras (Bénard-Valle *et al.*, 2020). Este tipo de toxinas podrían estar presentes en otras serpientes de coral como *M. fulvius*, cuyo veneno completo presenta una DL_{50} *i.v.* de 5.7 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, mientras que la toxina purificada más letal reportada posee una DL_{50} *i.v.* de 10.26 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (Vergara *et al.*, 2014). Sin embargo, en el caso de *M. laticollaris*, no se pudo observar tal fenómeno, ya que la letalidad del veneno completo es similar, o mayor, a la reportada para las toxinas purificadas, exceptuando a MlatA1 (Carbajal-Saucedo, 2014; el presente estudio).

Tanto los resultados obtenidos para *M. laticollaris* (este trabajo) como los encontrados por Henao-Duque y Núñez-Rangel (2016) en *M. mipartitus*, nos sugieren una posible variación intraespecífica, quizás independiente de la zona geográfica, en otras serpientes del género *Micrurus*, y que ésta a su vez, puede ser relevante para el tratamiento del accidente ofídico, ya que al existir individuos que carecen de al menos una de las toxinas más letales dentro del veneno, podemos prever que la evolución de un envenenamiento no sea siempre la misma. Así mismo, esta variación presupone un papel biológico complejo para el veneno de las serpientes de coral, como *M. laticollaris*, debido a que aún se desconoce si sus presas habituales, serpientes y anfisbénidos, son más o menos susceptibles a las α -neurotoxinas, como MlatA1, o a las β -neurotoxinas de tipo PLA₂ que representan los componentes mayoritarios.

A la fecha sólo se ha evaluado la acción específica, en presas potenciales, de toxinas de coralillos mexicanas de las especies *M. browni* y *M. tener*, destacando la última por poseer una toxina 3FTx, nombrada F11, que únicamente mostró letalidad en las serpientes *Conopsis lineata*, no observándose este efecto en ratones CD-1 (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Bénard-Valle *et al.*, 2020). En otros grupos de serpientes se han reportado toxinas únicamente con actividad sobre reptiles, tal es el caso del veneno de *Oxybelis fulgidus* donde se ha encontrado una 3FTx, nombrada “fulgimotoxina”, cuya acción letal sólo se vio reflejada en

lagartos de las especies *Anolis carolinensis* y *Hemidactylus frenatus* (DL_{50} i.v. 0.28 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y 0.6 $\mu\text{g}/\text{gr}$ respectivamente), sin embargo, no mostró letalidad en neonatos de *Mus musculus* (DL_{50} i.v. >5.0 $\mu\text{g}/\text{gr}$) (Heyborne y Mackessy, 2013).

La presencia/ausencia de toxinas ha sido reportada previamente para diferentes especies de la familia Viperidae, que habitan el territorio mexicano, como *Crotalus scutulatus*, *C. basiliscus* y *C. tzabcan*, donde a lo largo de su distribución existen individuos, o incluso poblaciones, carentes de una β -neurotoxina de tipo fosfolipasa A_2 llamada crotoxina (Colis-Torres *et al.*, 2022; Neri-Castro *et al.*, 2019; Strickland *et al.*, 2018). Aunque en los coralillos de América, la variación intraespecífica en los componentes del veneno esté escasamente documentada, cabe destacar que Henao-Duque y Núñez-Rangel (2016) encontraron, mediante RP-HPLC, que el veneno de al menos un individuo de *M. mipartitus* de Colombia carecía de la 3FTx Mipartoxina-1. Además, el presente estudio detalla un individuo de *M. laticollaris* (IBt-005) carente de la 3FTx MlatA1, así como dos ejemplares con porcentajes de MlatA1 cercanos a cero (0.2 y 0.3% respectivamente).

Al tomar en cuenta la variación observada en el veneno de otras familias de serpientes, podemos denotar que este es un fenómeno complejo, probablemente multifactorial.

7.2. Reconocimiento y neutralización con Coralmy[®]

El antiveneno anticoral de uso comercial en México (Coralmy[®]), el cual, teóricamente se produce usando como inmunógeno a *M. nigrocinctus*, ha mostrado buen reconocimiento y neutralización hacia los venenos con abundantes toxinas de tipo PLA_2 (Sánchez *et al.*, 2008). Al respecto, de Roodt *et al.* (2021) obtuvieron 4 antivenenos experimentales, 3 monovalentes y 1 polivalente, utilizando el veneno de las especies *M. nigrocinctus*, *M. fulvius* y *M. surinamensis*, los cuales compararon con 2 antivenenos de uso terapéutico (Coralmy[®], con fecha de expiración en 2004 y Suero Anti-*Micrurus* de Argentina, con fecha de

expiración en 2006), obteniendo títulos en ELISA similares hacia Coralmy[®] y el anti-*M. nigrocinctus* experimental (Figura 22). Los autores no evaluaron, de manera individual, la capacidad neutralizante del antiveneno experimental anti-*M. nigrocinctus*, sino que fue agregado a la mezcla polivalente que incluía los antivenenos experimentales anti-*M. fulvius* y anti-*M. surinamensis*. De Root *et al.*, (2021) compararon su antiveneno polivalente experimental con Coralmy[®] y el Suero Anti-*Micrurus*, mostrando una mayor neutralización con el antiveneno polivalente hacia los coralillos sudamericanos *M. surinamensis*, *M. pyrrhocryptus* y *M. altirostris*, que las mostradas por Coralmy[®], aunque con menor capacidad neutralizante que el Suero Anti-*Micrurus* hacia *M. pyrrhocryptus* y *M. altirostris*.

Sin embargo, cabe mencionar que es posible que el esquema de inmunización de Coralmy[®] incluya otras especies de coralillos mexicanas, tal vez debido a errores de identificación de los ejemplares, dado que habitan al menos 4 especies de manera simpátrica con *M. nigrocinctus* y algunos ejemplares pueden presentar una coloración muy similar que dificulta su correcta identificación (Reyes-Velasco *et al.*, 2020; Roze, 1996). Además, Reyes-Velasco *et al.*, (2020) mencionan que la coloración en las serpientes coralillos podría no ser suficiente para diferenciar a los individuos de algunas especies.

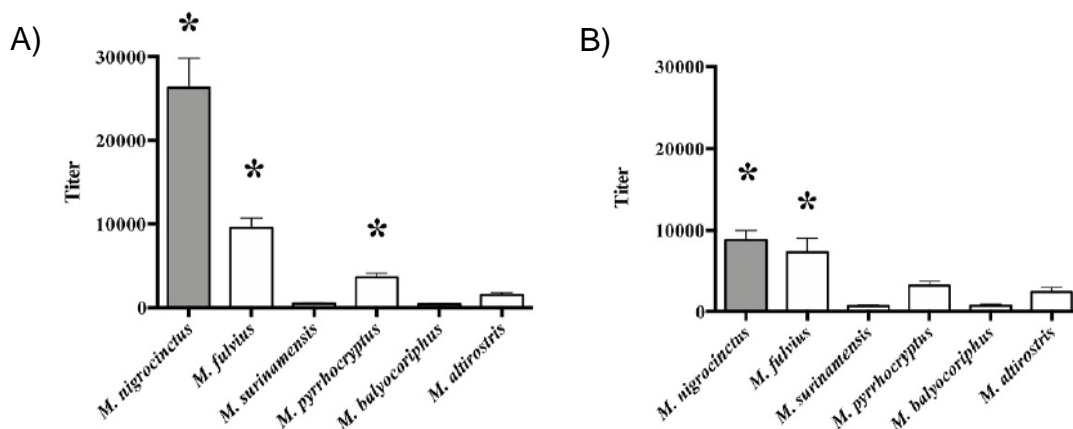


Figura 22. Títulos de los antivenenos Anti-*M. nigrocinctus* experimental (A) y Coralmy[®] (B) contra 6 especies de coralillos distribuidas a lo largo de América. Los asteriscos (*) muestran los títulos con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a los venenos sin asterisco. (Tomado y modificado de: de Roodt *et al.*, 2021).

También podemos notar que los antivenenos experimentales anti-*M. nigrocinctus* y Coralmyn[®], prácticamente no presentan reconocimiento hacia los venenos de las especies *M. surinamensis* y *M. balyocoriphus*, que, si bien la composición del segundo no ha sido estudiada, el veneno de *M. surinamensis* se conoce ampliamente y está conformado por un 95% de 3FTxs (Sanz *et al.*, 2019). Esto sólo explica parcialmente el bajo reconocimiento por los dos antivenenos mencionados, ya que *M. nigrocinctus* posee un 38% de 3FTxs y 48% de PLA₂ (Fernández *et al.*, 2011). No obstante, al tomar en cuenta las filogenias reportadas para las serpientes de coral, encontramos que *M. nigrocinctus* junto a *M. mosquitensis* son el grupo hermano de *M. latifasciatus*, las cuales, a su vez, forman el grupo hermano del complejo de especies de *M. diastema*, que incluye a la mayoría de las especies distribuidas en Norteamérica (Reyes-Velasco *et al.*, 2020), mientras que *M. surinamensis* y *M. balyocoriphus* pertenecen a grupos más alejados en la filogenia (Jowers *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2016) (Figura 23).

Dashevsky y Fry (2018), reportan que las 3FTxs de las serpientes de coral se pueden agrupar en al menos 8 clados, de acuerdo con análisis filogenéticos, sin embargo, las 3FTxs presentes en el veneno de una misma especie, pueden pertenecer a diferentes clados. Algunos clados incluyen toxinas de especies cercanas tanto en distribución como filogenéticamente, mientras que otros incluyen toxinas de especies presentes tanto en Norteamérica como en Sudamérica, con tiempos de divergencia variables de acuerdo con la filogenia reportada por Lee *et al.*, (2016). Sugiriendo que aún desconocemos mucho de la compleja historia evolutiva, tanto de las serpientes de coral como de sus toxinas, y el papel que juega en el reconocimiento y neutralización de sus toxinas con antivenenos.

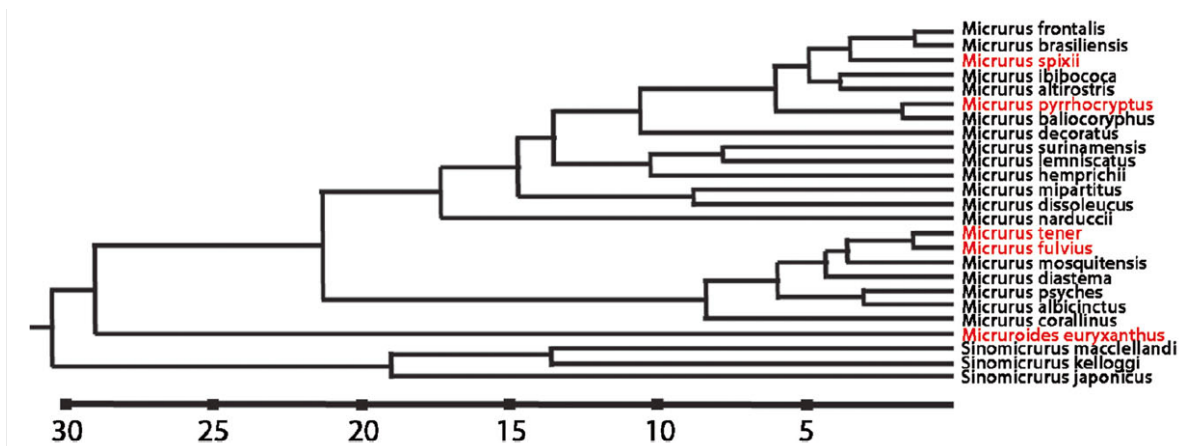


Figura 23. Relación filogenética de algunas de las especies más representativas de coralillos (*Micrurus spp.*). Los números indican millones de años de separación. Tomado de Lee *et al.*, 2016, modificado por Yang *et al.*, 2017.

Con esto en mente, resulta plausible que el alto reconocimiento del antiveneno Coralmyl[®], hacia las especies norteamericanas con abundantes PLA₂, podría estar relacionado también con la cercanía filogenética y no sólo con la abundancia de proteínas que constituyen la mezcla del veneno, puesto que se ha observado un mayor porcentaje de similitud en la secuencia de aminoácidos, en aquellas toxinas que corresponden a especies filogenéticamente cercanas (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Dokmetjian *et al.*, 2009; Guerrero-Garzón *et al.*, 2018; Jowers *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2016; Rey-Suárez *et al.*, 2017). Un ejemplo de ello, son algunos clados de 3FTxs reportados por Dashevsky y Fry (2018), que se conforman casi exclusivamente por serpientes norteamericanas y comparten un alto porcentaje en su secuencia de aminoácidos.

La filogenia reportada por Jowers *et al.*, (2019), sitúa a *M. laticollaris* como la especie basal de algunas serpientes de coral Sudamericanas utilizando el gen mitocondrial ND4 (Figura 24), lo cual concuerda con los altos porcentajes de similitud entre MlatA1 y otras α -neurotoxinas de cadena corta como MALT0051C de *M. altirostris* (91.5%) que se distribuye desde el sur de Brasil hasta el noreste de Argentina, D1 de *M. pyrrhocryptus* (91.5%) que se distribuye desde el suroeste de Brasil hasta el norte de Argentina y Paraguay y Ms1 de *M. surinamensis*

(89.5%) que se distribuye a lo largo de la región amazónica desde Guyana hasta el este de Ecuador y el norte de Bolivia (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Uetz *et al.*, 2023). Sin embargo, resalta la comparación de MlatA1 y la α -neurotoxina D.H. (88% de similitud), que se encuentra presente en diferentes especies de coralillos mexicanas como *M. browni*, *M. diastema* y *M. tener*, especies que filogenéticamente son más lejanas de *M. laticollaris* que las serpientes coralillos Sudamericanas, y de las cuales al menos *M. browni* es simpátrica con *M. laticollaris* (Guerrero-Garzón *et al.*, 2018; Jowers *et al.*, 2019; Roze, 1996).

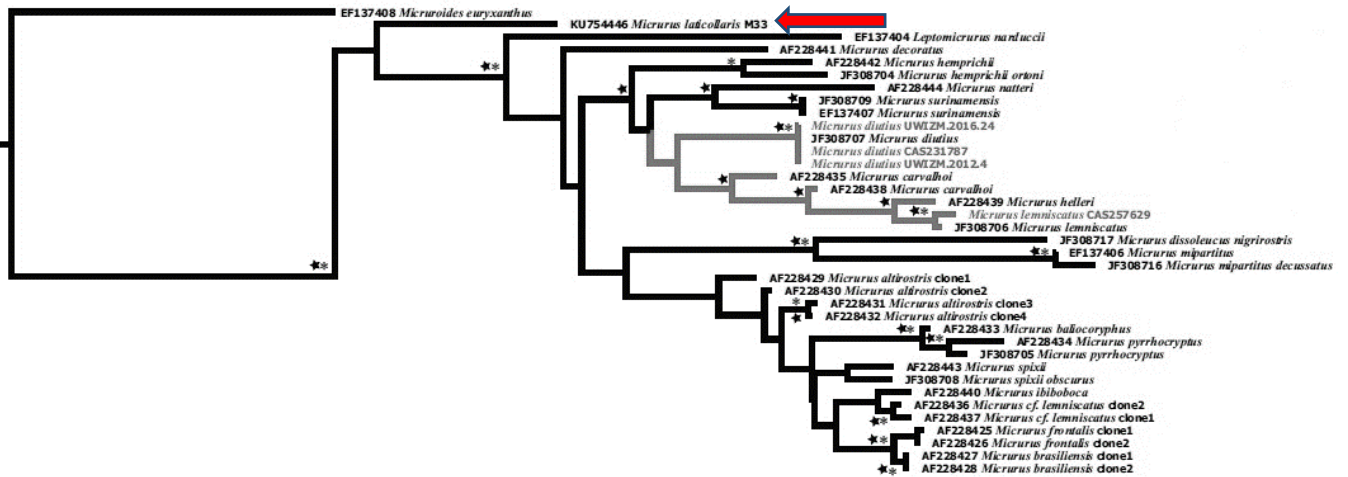


Figura 24. Árbol de máxima verosimilitud generado a partir del análisis RAxML para el gen ND4. Probabilidades de la inferencia bayesiana (BI) >0.95 y ML bootstraps >95% (★). La flecha en rojo indica la posición de *M. laticollaris*. Modificado de Jowers *et al.*, 2019.

A lo largo del rango de distribución de *M. laticollaris* podemos encontrar otras especies: *M. distans*, *M. browni* y *M. pachecogilli* (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010; Roze, 1996). Se conoce a detalle la composición del veneno de *M. browni* (Bénard-Valle *et al.*, 2020) y *M. distans* cuenta con una caracterización bioquímica y biológica (Campos-Arce, 2022), mientras que *M. pachecogilli* está siendo estudiada (Zarzosa *et al.*, en preparación). Tanto *M. browni* como *M. distans* presentan un veneno compuesto mayoritariamente por

PLA₂, composición que también se ha reportado en *M. laticollaris* (Carbajal-Saucedo, 2014).

El antiveneno Coralmy[®] es capaz de neutralizar de manera similar tanto a *M. browni* como a *M. pachecogili* (Tabla 4), las cuales son filogenéticamente cercanas (Reyes-Velasco *et al.*, 2020), mientras que *M. laticollaris* y *M. limbatus*, que son especies filogenéticamente más distantes (Jowers *et al.*, 2019; Reyes-Velasco *et al.*, 2020), han mostrado necesitar cantidades cercanas de antiveneno para ser neutralizadas (Tabla 4) (Carbajal-Saucedo, 2004; Zarzosa *et al.*, en preparación). El veneno de *M. limbatus* se compone mayoritariamente por 3FTxs (Bénard-Valle *et al.*, en preparación), por lo tanto, destaca que el veneno de *M. laticollaris*, que presenta un bajo porcentaje de 3FTxs (~6%), necesite cantidades similares de Coralmy[®] para ser neutralizado. Con estos datos podemos notar que la abundancia de PLA₂ y 3FTxs, en el veneno de las diferentes especies de coralillos, no son el único factor que determina la capacidad neutralizante de un antiveneno.

Tabla 4. Potencia neutralizante de Coralmy[®] contra algunas especies de coralillos mexicanas.

Veneno	Coralmy [®] mgAV/mgV
<i>M. b. browni</i> ¹	11.16
<i>M. distans</i> ¹	32.98
<i>M. pachecogili</i> ²	12.02
<i>M. laticollaris</i> ¹	77.77
<i>M. limbatus</i> ¹	70.18

mgAV/mgV= miligramos de antiveneno que neutralizan 1 miligramo de veneno. 1-Carbajal-Saucedo, 2004; 2- Zarzosa *et al.*, en prep.

Al comparar la neutralización de las toxinas purificadas, así como del individuo IBt-005 de *M. laticollaris* (el cual no posee MlatA1), realizados en este trabajo, con algunos venenos completos, obtenemos un panorama general que indica una buena neutralización de las toxinas de tipo PLA₂ a la par que corrobora las diferencias en la capacidad neutralizante entre los lotes de Coralmy[®] (Tabla 5). Sin embargo, en el ámbito clínico resulta problemático que toxinas como MlatA1 sean tan mal neutralizadas, ya que se requieren aproximadamente 61 veces más F(ab')₂ del lote B-0E-33, para neutralizar 1 mg de dicha toxina, en comparación con el veneno completo del individuo IBt-005 neutralizado con el lote B-2H-12, que carecía de ella (Tabla 3; Tabla 5).

Tabla 5. Neutralización específica de diferentes lotes de Coralmy[®] contra coralillos mexicanas y las toxinas purificadas de *M. laticollaris*.

Veneno	Coralmy [®] mgAV/mgV	Lote Coralmy [®]
<i>M. b. browni</i>	11.16	B-2D-06
<i>M. distans</i>	32.98	B-2D-06
<i>M. limbatus</i>	70.18	B-2D-06
<i>M. limbatus</i>	>146.2	B-2H-12
<i>M. limbatus</i>	173.3	B-0E-33
<i>M. pachecogili</i>	12.02	B-2H-12
<i>M. pachecogili</i>	44.57	B-0E-33
<i>M. laticollaris</i>	77.77	B-2D-06
<i>M. lat.</i> IBt-005	13.4	B-2H-12
MlatA1	>1425.4	B-2H-12
MlatA1	818.9	B-0E-33
PLA ₂ B	13.01	B-2H-12
PLA ₂ C	11.8	B-2H-12
PLA ₂ D	18.2	B-2H-12

mgAV/mgV= miligramos de antiveneno que neutralizan 1 miligramo de veneno.

Un caso similar ocurre con *M. limbatus*, cuyo veneno posee al menos 2 3FTx letales, con posible acción de tipo α -neurotóxica y una PLA₂ letal con posible

actividad β -neurotóxica (Bénard-Valle *et al.*, en preparación) y aunque sea posible neutralizar su veneno con el lote B-0E-33, se requieren cantidades muy elevadas de antiveneno. Los títulos de ELISA alcanzados tanto para *M. laticollaris* como para *M. limbatus*, son cercanos al utilizar los mismos lotes de Coralmy[®], usados en el presente estudio (Figura 25), aunque existen diferencias notables en su neutralización entre lotes (Tabla 5).

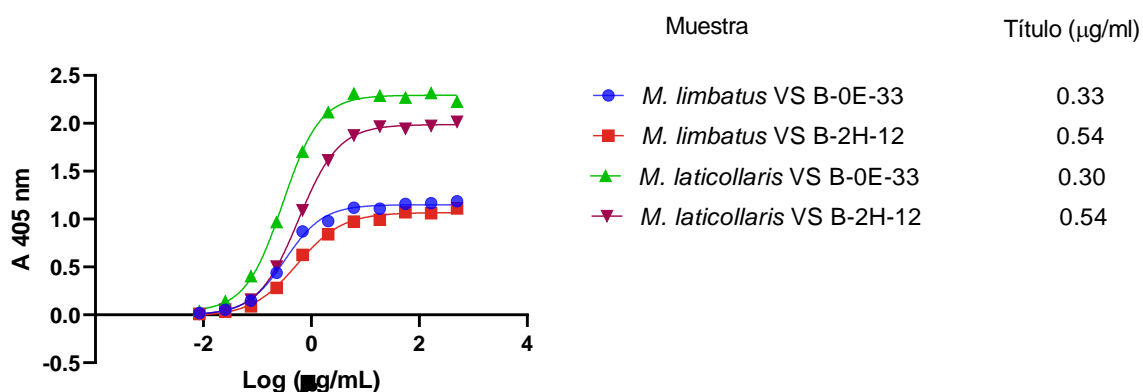


Figura 25. Títulos obtenidos por ELISA, usando dos lotes de Coralmy[®] (B-2H-12 y B-0E-33) contra *M. limbatus* y *M. laticollaris*. Elaboración personal.

Es oportuno observar que las diferencias en la neutralización de Coralmy[®] entre lotes, son un problema que afecta tanto al personal médico, que se encarga de tratar estos envenenamientos, como a los pacientes cuya vida depende de la eficacia del antiveneno. Ya que una mala experiencia con un lote puede hacer que el médico desconfíe del antiveneno. Por otro lado, una muy buena experiencia puede hacer que use una dosis demasiado baja de antiveneno después. Dificultando la estandarización de un protocolo de atención.

Las 3FTxs y las PLA₂, son los componentes mayoritarios de los venenos de coralillos y presentan diferencias importantes tanto en tamaño, con alrededor de 7 y 13 KDa respectivamente, como en su secuencia de aminoácidos, y, por ende, en su estructura terciaria, lo que les confiere diferentes capacidades estimulantes del

sistema inmune (inmunogenicidad) (Kindt *et al.*, 2007). Carbajal-Saucedo (2004) mostró que los sueros experimentales anti-*distans* (anti-*M. distans*) y anti-*laticollaris* (anti-*M. laticollaris*) tienen diferentes potenciales neutralizantes al compararlos con Coralmyn® (anti-*M. nigrocinctus*), sugiriendo incluso que el suero experimental anti-*distans*, es mejor que los otros dos neutralizando el veneno de algunas especies de coralillos mexicanas. Además, es importante considerar que no sólo la heterogeneidad en la composición del veneno, de las diferentes especies de coralillos, sino que también, las diferencias en la abundancia de toxinas de los individuos, usados para la inmunización, podrían culminar en antivenenos con una capacidad neutralizante heterogénea. Al respecto, cabe recordar que los antivenenos actuales usados en accidentes ofídicos, se producen a partir de la inmunización de grandes mamíferos con veneno de una o varias especies y éste no siempre se obtiene de los mismos individuos (Vargas *et al.*, 2021).

En el presente estudio se obtuvo evidencia que corrobora, que los individuos de *M. laticollaris* presentan diferencias intraespecíficas en la composición de su veneno y que esta variación es relevante en la neutralización con antivenenos. Además, los dos lotes de Coralmyn® evaluados, poseen diferencias importantes en la potencia neutralizante y la inmunoreactividad cruzada (Tabla 3; Tabla 5).

7.3. Envenenamiento en humanos

Cuando hablamos de neutralización del veneno en humanos, resulta preponderante considerar la cantidad de veneno que pueden inocular los individuos de *M. laticollaris*, por ende, a partir de los registros históricos de ordeñas realizadas en el Herpetario Cantil-IBt-UNAM, se construyó una gráfica con la finalidad de ilustrar cuanto veneno podría ser inyectado en un accidente ofídico real. Se obtuvieron resultados variados, que van desde los 0.7 mg hasta los 59.7 mg de veneno seco o liofilizado (Figura 26).

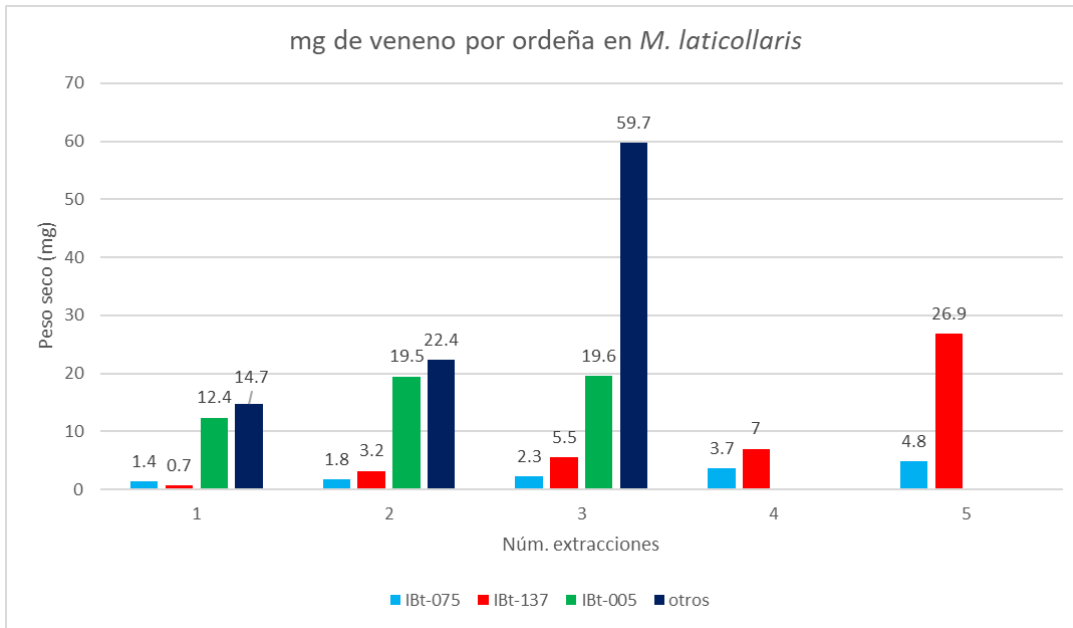


Figura 26. Cantidades de veneno seco, reportado en mg, obtenidos por ordeña de diferentes ejemplares de *M. laticollaris*. Las ordeñas no son consecutivas y están ordenadas de menor a mayor. Datos obtenidos de los registros del Herpetario Cantil-IBt-UNAM.

De acuerdo con observaciones personales, es posible obtener mayores cantidades de veneno en las ordeñas, no sólo de ejemplares con una mayor talla (longitud hocico-cloaca), sino de aquellos con una mayor condición corporal, aunque, cuando se trata de animales en cautiverio, resulta problemático mantener una alta condición corporal, debido a la dieta tan específica de estos organismos aunado a la falta de información acerca de sus presas naturales.

Teniendo conocimiento tanto de las cantidades de veneno que pueden inocular los individuos de *M. laticollaris*, como de la variación intraespecífica, que afecta los porcentajes de toxinas que componen el veneno, podemos estimar la cantidad máxima de una toxina determinada, que puede estar actuando en caso de un accidente ofídico en humanos. Debido a que las PLA₂ son bien reconocidas y neutralizadas, únicamente se consideró aquí a la 3FTx MlatA1, que si bien representa un bajo porcentaje del veneno (del 0 al 8%), al aumentar la cantidad de veneno en cuestión y debido a su baja neutralización, puede dificultar la recuperación de los pacientes, así como los costos de atención. Tomando como

referencia dos ejemplares de *M. laticollaris* con número de registro IBt-075 e IBt-137, que, a la fecha, forman parte del Herpetario Cantil y que fueron incluidas en el presente estudio, se estimó cuantas DL₅₀s era capaz de alcanzar la toxina MlatA1 en humanos y qué cantidad de antiveneno era necesaria para neutralizarla, utilizando dos lotes de Coralmyl: B-2H-12 y B-0E-33 (Tabla 6). Además, con fines comparativos, se realizó la misma estimación con un individuo del que se tiene registro de ordeña, pero no fue posible agregar al estudio por falta de veneno disponible. Para la comparación, se utilizaron los porcentajes de MlatA1 mínimos (0%) y máximos (7.9%) obtenidos en los individuos analizados en este estudio.

De acuerdo con la Cámara Nacional de la Industria del Vestido (CANAIVE, 2012) los hombres y mujeres mexicanas pesan en promedio 74.8 y 68.7 Kg respectivamente. Debido a que el peso reportado para ambos sexos es muy cercano, se decidió tomar el promedio general de las y los mexicanos para las siguientes estimaciones: 71.7 Kg. Extrapolando a humanos la DL₅₀ de MlatA1, reportada por Carbajal-Saucedo (2014), se necesitarían 4.9 mg de la toxina MlatA1, para alcanzar 1 DL₅₀ en una persona de 71.7 Kg.

Tabla 6. Comparación de la cantidad y DL₅₀s de MlatA1 alcanzada en humanos, a partir de las muestras de veneno de 3 individuos de *M. laticollaris*, con los mg de Coralmyl® necesarios para neutralizarla.

Ejemplar	mg de veneno por ordeña	% MlatA1	µg MlatA1	DL ₅₀ s de MlatA1 en humanos	mg Av (B-2H-12) /mg toxina	mg Av (B-0E-33) /mg toxina
Ibt-137	0.7	3.4	23.8	0.005	>34.3	19.5
Ibt-137	26.9	3.4	941.5	0.2	>1317.0	749.0
Ibt-075	1.4	6.6	92.4	0.02	>133.1	75.7
Ibt-075	4.8	6.6	316.8	0.1	>456.2	259.4
<i>M. laticollaris</i> (SN) ¹	59.7	0	-	-	-	-
<i>M. laticollaris</i> (SN) ¹	59.7	7.9	4716.3	1	>6791.5	3862.2

Mg AV/mg toxina: miligramos de antiveneno capaces de neutralizar las DL₅₀s de MlatA1 estimadas. **B-2H-12:** lote de Coralmyl® con baja proporción de anticuerpos anti-3FTxs. **B-0E-33:** lote de Coralmyl® con alta proporción de anticuerpos anti-3FTxs. **(SN)¹:** individuo sin número de registro, que no formó parte del presente estudio. Se tomaron como referencia, para la estimación, los mg calculados en la neutralización específica (Tabla 3; Tabla 5).

Este análisis nos muestra que en los individuos IBt-137 e IBt-075, la toxina MlatA1 no alcanza 1 DL₅₀ en humanos, con las cantidades de veneno obtenidas por ordeña. En el caso del individuo IBt-075, que posee la segunda proporción más alta de MlatA1 dentro de este estudio (6.6%) (Tabla 2), la cantidad de veneno obtenido por ordeña era baja y no superaba los 5 mg (Figura 26). Por otra parte, el individuo IBt-137, fue capaz de suministrar 26.9 mg de veneno en una sola ordeña, más de 5 veces la cantidad máxima reportada para el individuo IBt-075 (Figura 26), pero la proporción de MlatA1 dentro de su veneno es de 3.4% (Tabla 2), que en un envenenamiento en humanos resultaría en 0.2 DL₅₀s (Tabla 6).

El individuo *M. laticollaris* SN, tuvo el registro más elevado de mg de veneno por ordeña, dentro de los individuos de *M. laticollaris* depositados en la base de datos del Herpetario Cantil, con 59.7 mg (Figura 26). Debido a que no se contó con veneno del individuo durante la realización de este estudio, se desconoce el porcentaje de MlatA1 en su veneno. Sin embargo, aquí se optó por presentar las estimaciones correspondientes al mínimo y máximo porcentaje de MlatA1, tomado de la información recabada en los 21 individuos analizados para este estudio (Tabla 2). Dicha estimación se realizó con fines comparativos e ilustra de manera clara lo que podría ocurrir en un accidente ofídico con un individuo de esta especie, capaz de inocular una gran cantidad de veneno, ya que si la proporción de MlatA1, en el veneno del individuo *M. laticollaris* SN, fuera del 7.9% alcanzaría 1 DL₅₀ (Tabla 6). Empero, podría ocurrir la situación contraria, presentando un porcentaje de MlatA1 del 0%, en cuyo caso, las PLA₂ del veneno serían bien neutralizadas por Coralmyn[®] aún con una alta dosis (Tabla 3).

El análisis de las cantidades de antiveneno necesarias para neutralizar MlatA1, nos permite resaltar el alto costo monetario que puede suponer un envenenamiento en humanos por esta especie. Tomando en cuenta al individuo IBt-137, si se inocularan 0.7 mg de veneno en un humano, serían necesarios para neutralizar a MlatA1, más de 34.3 mg del lote B-2H-12 o 19.5 mg del lote B-0E-33 de Coralmyn[®], sin embargo, si el accidente involucrara la cantidad de veneno más alta registrada para este individuo (26.9 mg) (Figura 26), serían necesarios más de

1317 mg del lote B-2H-12 o 749 mg del lote B-0E-33 de Coralmy[®] (Tabla 6). Todos los viales de Coralmy[®], usados en el presente estudio, contenían de 30 a 50 mg totales de F(ab')₂ y su precio recomendado por Laboratorios SILANES es de \$4,724.00 MXN por vial. Además, en una persona que tuviera un peso menor al usado en las estimaciones, como infantes, adolescentes o adultos de baja estatura o compleción, la proporción de DL₅₀s de MlatA1 aumentaría, necesitando una mayor dosis de antiveneno para ser neutralizada.

Conocer la variación intraespecífica de los componentes del veneno en las especies de importancia médica (como *M. laticollaris*) nos permite prever posibles escenarios en caso de un accidente ofídico, también ofrece información de los individuos que componen una población y nos habla del complejo papel que juega el veneno en su supervivencia, a veces como depredadores y otras siendo presas.

8. Conclusiones

- Existe variación intraespecífica en la abundancia de toxinas en el veneno de los individuos de *M. laticollaris*, sin embargo, no se observó una correlación evidente entre esta variación y el sitio de colecta de los individuos.
- La variación en la abundancia de toxinas de los individuos de *M. laticollaris* se mantuvo a lo largo del tiempo.
- Parecen existir diferencias en la abundancia de los componentes entre las subespecies: *M. laticollaris laticollaris* y *M. laticollaris maculirostris*.
- Los lotes de Coralmy[®] analizados, B-2H-12 y B-0E-33, presentan diferentes capacidades de reconocimiento y neutralización ante el veneno y las toxinas puras de *M. laticollaris*.
- Las toxinas de tipo PLA₂ son bien reconocidas y neutralizadas por el lote de Coralmy[®] B-2H-12, que contiene pocos anticuerpos específicos para 3FTxs.

- La abundancia de la α -neurotoxina MlatA1 repercute de manera directa en la neutralización con el lote B-2H-12 cuando la dosis es elevada.
- El lote B-0E-33 de Coralmyl[®], es capaz de neutralizar a MlatA1, sin embargo, se requieren grandes cantidades de antiveneno.
- Los individuos carentes de MlatA1 son bien neutralizados por el lote B-2H-12, siendo esta la primera evidencia concreta de la importancia de la variación intraespecífica en la neutralización del veneno de coralillos (*Micrurus spp.*).
- La abundancia de MlatA1 puede conllevar un aumento, en el costo de la atención, ante un envenenamiento por *M. laticollaris*, cuando la dosis de veneno inoculado es elevada.

9. Referencias

- Aird, S.D., da Silva, N. J., Qiu, L., Villar-Briones, A., Saddi, V. A., Pires de Campos Telles, M., Grau, M. L. y Mikheyev, A. S. (2017). Coralsnake venomomics: analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. *Toxins*, 9, E187.
- Barber, C. M., Isbister, G. K., & Hodgson, W. C. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon*, 66: 47-58.
- Barros, A.C., Fernandes, D.P., Ferreira, L.C., Dos Santos, M.C. (1994). Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes). *Toxicon*, 32: 445–452.
- Bénard-Valle, M., Carbajal-Saucedo, A., de Roodt, A., López-Vera, E. y Alagón, A. (2014). Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*, 77: 6-15
- Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E., Elizalde-Morales, N., Olvera-Rodríguez, A., Strickland, J., Acosta, G., & Alagón, A. (2021). Protein composition and biochemical characterization of venom from Sonoran Coral Snakes (*Micruroides euryxanthus*). *Biochimie*, 182: 206-216.
- Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E. E., Fry, B. G., Boyer, L., Cochran, C., Alam, M., Jackson, T. N. W., Paniagua, D., Olvera-Rodríguez, F., Koludarov, I., Sunagar, K., y Alagón, A. (2015). Antivenom research and development. En B. G. Fry (Ed.), *Venomous Reptiles: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery* (pp. 62-72). New York, U. S. A: Oxford University Press.
- Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E., Yañez-Mendoza, M. F., Lomonte, B., Olvera, A., Zamudio, F., Restano-Cassulini, R., Possani, L. D., Jiménez-Ferrer, E., y Alagón, A. (2020). Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: Identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. *Journal of Proteomics*, 225: 103863.
- Bolaños, R., Cerdas, L., y Abalos, J. W. (1978). Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalent antivenin for the Americas. *PAHO Bulletin*, 12(1): 23-27.
- Bolaños, R., Cerdas, L., y Taylor, R. (1975). The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus hertwigi*) antivenin. *Toxicon*, 13(2): 139-142.

- Boyer, L., Alagón, A., Fry, B. G., Jackson, T. N. W., Sunagar, K. y Chippaux, J. P. (2015). Signs, Symptoms and Treatment of Envenomation. En B. G. Fry (Ed.), *Venomous Reptiles: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery* (pp. 32-60). New York, U. S. A: Oxford University Press.
- Braga, J. R. M., Jorge, A. R. C., Marinho, A. D., de Moraes -Silveira, J. A., Nogueira-Junior, F. A., Benard-Valle, M., Alagon, A., de Menezes, R. R. P. P., Martins, A. M. C., Feijao, L. X., Monteiro, H. S. A. y Jorge, R. J. B. (2020). Renal effects of venoms of Mexican coral snakes *Micrurus browni* and *Micrurus laticollaris*. *Toxicon*, 181: 45-52.
- Burke, J. E. y Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A₂ Biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*, 23(1): 49.
- Cambell, J. A. y Lamar, W. W. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere Vol. 1. Cornell University Press, Ithaca, U. S. A.
- Campos-Arce, J. C. (2022). Caracterización bioquímica y biológica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus distans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- CANAIVE. (2012). ¿Cuánto mide México? Cámara Nacional de la Industria del Vestido. México.
- Canseco Márquez, L., y Gutiérrez-Mayen, G. (2010). Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Fundación Para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán, A.C., México, D.F., y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Carbajal-Saucedo, A. (2014). Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de *Micrurus laticollaris*: bases para el desarrollo de un antiveneno de amplio espectro contra coralillos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carbajal-Saucedo, A. (2004). Comparación inmunoquímica del veneno de serpientes de coral (Elapidae: *Micrurus*, *Micruroides*) mexicanas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Carbajal-Saucedo, A, Floriano, R.S., Dal Belo, C.A., Olvera-Rodríguez, A, Alagón, A. y Rodrigues-Simioni, L. (2014). Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (squamata: Elapidae) venom in vitro. *Toxins*, 6(1): 359–370.
- Carbajal-Saucedo, A., López-Vera, E., Bénard-Valle, M., Smith, E.N., Zamudio, F., de Roodt, A.R. y Olvera-Rodríguez, A. (2013). Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (squamata: Elapidae). *Toxicon*, 66: 64–74.
- Casasola, A., Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A.R., Carbajal-Saucedo, A., Chippaux, J.P., Alagón, A. y Stock, R.P. (2009). Neutralización paraespecífica del veneno de especies africanas de cobra por un antisuero equino contra *Naja melanoleuca*: un estudio comparativo. *Toxicon* 53(6): 602–608.
- Castillo-Beltrán, M. C., Hurtado-Gómez, J. P., Corredor-Espinell, V. y Ruiz-Gómez, F. J. (2019). A polyvalent coral snake antivenom with broad neutralization capacity. *PLoS Negl Trop Dis* 13(3): e0007250.
- Chacón, D., Rodríguez, S., Arias, J., Solano, G., Bonilla, F. y Gómez, A. (2012). Maintaining Coral Snakes (*Micrurus nigrocinctus*, Serpentes: Elapidae) for venom production on an alternative fish-based diet. *Toxicon*, 60: 249-253.
- Chippaux, J. P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(6): e0005662.
- Colis-Torres, A., Neri-Castro, E., Strickland, J. L., Olvera-Rodríguez, A., Borja, M., Calvete, J., Jones, J., Parkinson, C. L., Bañuelos, J., López de León, J. y Alagón, A. (2022). Intraspecific venom variation of Mexican West Coast Rattlesnakes (*Crotalus basiliscus*) and its implications for antivenom production. *Biochimie*, 192: 111-124.
- Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M., Silva, D. A., Ho, P. L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M. L. M., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R. B., & Calvete, J. J. (2011). Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *Journal of Proteomics*, 74(9): 1795-1809.
- Dávila, P. E. B., Takahashi, H. S. y Barbosa, M. H. O. (2014). Natural History Notes. *Micrurus surinamensis* (Aquatic Coralsnake). *Behavior. Herpetological Review* 45: 340.

- Dashevsky, D., Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E., Youngman, N. J., Zdenek, C. N., Alagón, A., Portes-Junior, J. A., Frank, N., y Fry, B. G. (2021). Anticoagulant *Micrurus* venoms: Targets and neutralization. *Toxicology Letters*, 337: 91-97.
- Dashevsky, D., y Fry, B. G. (2018). Ancient Diversification of Three-Finger Toxins in *Micrurus* Coral Snakes. *Journal of Molecular Evolution*, 86(1): 58-67.
- de Roodt, A. R., Lanari, L. C., Estévez-Ramírez, J., Gómez, C., Barragán, J., Litwin, S., van Grootheest, J. H., Desio, M., Dokmetjian, J. C., Dolab, J. A., Damin, C. F. y Alagón, A. (2021). Cross-reactivity of some *Micrurus* venoms against experimental and therapeutic anti-*Micrurus* antivenoms. *Toxicon*, 200: 153-164.
- de Roodt, A. R., Paniagua-Solis, J. F., Dolab, J. A., Estévez-Ramírez, J., Ramos-Cerrillo, B., Litwin, S., Dokmetjian J.C. y Alagón, A. (2004). Effectiveness of Two Common Antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* Envenomations. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2): 171–178.
- Dokmetjian, J.C., del Canto, S., Vinzón, S., de Jiménez-Bonino, M.B. (2009). Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*, 53: 375-382.
- Doley, R., Zhou, X. y Kini, R. M. (2010). Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes. En S. P. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* (pp. 173-205). Boca Raton, U. S. A.: *CRC Press Taylor & Francis Group*.
- Fernández, J., Alape-Girón, A., Angulo, Y., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Lomonte, B. (2011). Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J. Proteome Res.* 10: 1816-1827.
- Flores-Villela, O. y García-Vázquez, U. O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 467–475.
- Fry, B. G., Lumsden, N. G., Wüster, W., Wickramaratna, J. C., Hodgson, W. C., & Manjunatha Kini, R. (2003). Isolation of a Neurotoxin (α -colubritoxin) from a Nonvenomous Colubrid: Evidence for Early Origin of Venom in Snakes. *Journal of Molecular Evolution*, 57(4): 446-452.
- Fry, B. G., Undheim, E. A. B., Ali, S. A., Jackson, T. N. W., Debono, J., Scheib, H., Ruder, T., Morgenstern, D., Cadwallader, L., Whitehead, D., Nabuurs, R., van Weerd, L. der, Vidal, N., Roelants, K., Hendriks, I., Gonzalez, S. P., Koludarov, I., Jones, A., King, G.

F., Antunes, A. y Sunagar, K. (2013). Squeezers and leaf-cutters: Differential diversification and degeneration of the venom system in toxicoferan reptiles. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(7): 1881-1899.

- GBIF (Global Biodiversity Information Facility). (2024). *Bipes canaliculatus*. Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.fp7bj7> (Consultado en febrero 2024).

- GBIF (Global Biodiversity Information Facility). (2024). *Micrurus laticollaris*. Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.4s8nch> (Consultado en junio 2024).

- Guadarrama-Martínez, A. (2023). Comparación del nivel de reconocimiento y neutralización de tres antivenenos mexicanos hacia el veneno de nueve especies de Vipéridos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Guerrero-Garzón, J.F., Bénard-Valle, M., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Corzo, G., Alagón, A. y Olvera-Rodríguez, A. (2018). Cloning and sequencing of three-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expresión of an alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*. *Biochimie*, 147: 114–121.

- Gutiérrez, J. M., León, G., y Lomonte, B. (2003). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(8), 721–741.

- Hegde, R. P., Rajagopalan, N., Doley, R. y Kini, M. (2010). Snake Venom Three-Finger Toxins. En S.P. Mackessy (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, First Edition (pp. 287-301). Boca Raton, U. S. A.: *CRC Press Taylor & Francis Group*.

- Heimes P. (2016). *Herpetofauna Mexicana Vol. 1, Snakes of Mexico*. Chimaira. Frankfurt, Germany.

- Henao-Duque, A.M. y Núñez-Rangel, V., (2016). Maintenance of red-tail coral snake (*Micrurus mipartitus*) in captivity and evaluation of individual venom variability. *Acta biol. Colomb.* 21(3): 593-600.

- Heyborne, W. H. y Mackessy, S. P. (2013). Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelis fulgidus*; family Colubridae). *Biochimie*, 95: 1923-1932.

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2023). Conjunto Nacional de Datos Topográficos. Curvas de Nivel. Escala 1:250,000. INEGI, México.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2019). Marco Geoestadístico Integrado. INEGI, México.
- Jackson, D. R. y Franz, R. (1981). Ecology of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) in northern peninsular florida. *Herpetologica*, 37(4): 213-228.
- Johnson, J. D., Wilson, L. D., Mata-Silva, V., García-Padilla, E. y DeSantis, D. L. (2017). The endemic herpetofauna of Mexico: organisms of global significance in severe peril. *Mesoamerican Herpetology*, 4(3): 543-620.
- Jowers, M.J., Garcia-Mudarra, J.L., Charles, S.P. y Murphy, J.C. (2019). Phylogeography of West Indies Coral snakes (*Micrurus*): Island colonisation and banding patterns. *Zoologica scripta*: 1-14.
- Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Ching, A. T. C., Carvalho, E., Faria, F., Nishiyama, M. Y., Ho, P. L., & Diniz, M. R. V. (2006). *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: Implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics*, 173(2): 877-889.
- Kalliyana Krishnan, L. (2015). Rabbit Snake-Bite Model to Assess Safety and Efficacy of Anti-Viper Chicken Antibodies (IgY). *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 3(1): 32-38.
- Kardong, K. V. (2012). *Vertebrates: Comparative anatomy, function, evolution*, 6th edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York, N. Y., U. S. A.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A. y Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*, Sexta Edición. The McGraw-Hill Companies, Inc. Ciudad de México, México.
- Laustsen, A. H. (2016). Toxin synergism in snake venoms. *Toxin Rev*, DOI: 10.1080/15569543.2016.1220397
- Laustsen, A. H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernández, J. y Gutiérrez, J. M. (2015). Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. *J Prot*, 119: 126-142.

- Lee, M.S.Y., Sanders, K.L., King, B. y Palci, A. (2016) Diversification rates and phenotypic evolution in venomous snakes (Elapidae). *R. Soc. open sci.* 3, 150277.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N., Bénard-Valle, M., Sanz, L., Corrêa-Netto, C., Núñez, V., Alape-Girón, A., Alagón, A., Gutiérrez, J. M. y Calvete, J. J. (2016). Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*, 122: 7-25.
- Lomonte, B., Sasa, M., Rey-Suárez, P., Bryan, W. y Gutiérrez, J. M. (2016). Venom of the Coral Snake *Micrurus clarki*: Proteomic Profile, Toxicity, Immunological Cross-Neutralization, and Characterization of a Three-Finger Toxin. *Toxins*, 8, 138.
- Mackessy, S. P. (Ed.). (2010). Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, U. S. A.: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Markland, F. S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36(12): 1749-1800
- Marques, O. A. V. y Sazima, I. (1997). Diet and feeding behavior of the coral snake, *Micrurus corallinus*, from the Atlantic Forest of Brazil. *Herpetological Natural History*, 5(1): 88-93.
- Marques-Souza, S., Braga-Junqueira, A., Conte-Jakovac, A. C., Apóstolo-Assunção, P. y Correia, J. A. (2011). Feeding behavior and ophiophagous habits of two poorly known amazonian coral snakes, *Micrurus albicinctus* Amaral 1926 and *Micrurus paraensis* Cunha and Nascimento 1973 (Squamata, Elapidae). *Herpetology Notes*, 4: 369-372.
- Morais, V. M. y Massaldi, H. (2009). Snake Antivenoms: Adverse Reactions and Production Technology. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 15(1): 2-18.
- Moreira, K. G., Prates, M. v., Andrade, F. A. C., Silva, L. P., Beirão, P. S. L., Kushmerick, C., Naves, L. A., & Bloch, C. (2010). Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*, 56(1): 55-63.
- Neri-Castro, E., Hernández-Dávila, A., Olvera-Rodríguez, A., Cardoso-Torres, H., Bénard-Valle, M., Bastiaans, E., López-Gutierrez, O. y Alagón A. (2019). Detection and

quantification of a β -neurotoxin (crotoxin homologs) in the venom of the rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. culminatus* and *C. tzabcan* from Mexico. *Toxicon* X (2): 100007.

- Olamendi-Portugal, T., Batista, C. V. F., Pedraza-Escalona, M., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F. Z., Benard-Valle, M., Rafael de Roodt, A., y Possani, L. D. (2018). New insights into the proteomic characterization of the coral snake *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*, 153: 23-31.
- Olamendi-Portugal, T., Batista, C. V. F., Restano-Cassulini, R., Pando, V., Villa-Hernández, O., Zavaleta-Martínez-Vargas, A., Salas-Arruz, M. C., Rodríguez de la Vega, R. C., Becerril, B. y Possani, L. D. (2008). Proteomic analysis of the venom from the fish-eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*, 8: 1919–1932.
- Paniagua, D., Jiménez, L., Romero, C., Vergara, I., Calderón, A., Benard, M., Bernas, M. J., Rilo, H., de Roodt, A., D'Suze, G., Witte, M. H., Boyer, L., y Alagón, A. (2012). Lymphatic route of transport and pharmacokinetics of *Micrurus fulvius* (coral snake) venom in sheep. *Lymphology*, 45(4).
- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Janke, R., Bermúdez-Méndez, E., Ledsgaard, L., Barbosa, J. E., y Laustsen, A. H. (2019). History of envenoming therapy and current perspectives. In *Frontiers in Immunology*, 10: 1598.
- Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., Cruz-Elizalde, R., Berriozabal-Islas, C., Lara-Tufiño, D., Goyenechea Mayer-Goyenechea, I., y Castillo-Cerón, J. M. (2014). *Los Anfibios y Reptiles de Hidalgo, México: Diversidad, Biogeografía y Conservación*. Sociedad Herpetológica Mexicana A.C., Pachuca, Hidalgo, Mexico.
- Ranawaka, U.K., Lalloo, D.G. y de Silva, H.J. (2013). Neurotoxicity in Snakebite—The Limits of Our Knowledge. *PLoS Negl Trop Dis* 7(10): e2302.
- Reyes-Velasco, J., Adams, R. H., Boissinot, S., Parkinson, C. L., Campbell, J. A., Castoe, T. A., y Smith, E. N. (2020). Genome-wide SNPs clarify lineage diversity confused by coloration in coralsnakes of the *Micrurus diastema* species complex (Serpentes: Elapidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 147: 106770.
- Rey-Suárez, P., Floriano, R. S., Rostelato-Ferreira, S., Saldarriaga-Córdoba, M., Núñez, V., Rodrigues-Simioni, L., y Lomonte, B. (2012). Mipartoxin-I, a novel three-finger

toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon*, 60(5): 851-863.

- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Fernández, J. y Lomonte, B. (2016). Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. *J Prot*, 136, 262e273.
- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Gutiérrez, J.M. y Lomonte, B. (2011). Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Prot*, 75, 655-667
- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Saldarriaga-Córdoba, M. y Lomonte, B. (2017). Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A₂ from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. *Biochimie* 137: 88-98.
- Rios-Soto, J. A., Arango-Lozano, J. y Rivera-Molina, F. A. (2018). *Micrurus mipartitus* (Duméril, Bibron y Duméril, 1854). Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia, 4(1): 37-44.
- Roze, J. A. (1996). Coral Snakes of the America: Biology, identification and venoms. Krieger Publ. Comp. Malabar, Florida.
- Sánchez, E.E., Lopez-Johnston, J.C., Rodríguez-Acosta, A. y Pérez, J.C. (2008). Neutralization of two north American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. *Toxicon*, 51(2): 297–303.
- Sanz, L., de Freitas-Lima, L.N., Quesada-Bernat, S., Graça-de-Souza, V.K., Soares, A.M., Calderón, L.d.A., Calvete, J.J. y Caldeira, C.A.S. (2019). Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. *Toxicon* 166: 39-45.
- Sanz, L., Quesada-Bernat, S., Ramos, T., Casais-e-Silva, L. L., Corrêa-Netto, C., Silva-Haad, J. J., Sasa, M., Lomonte, B. y Calvete, J. J. (2019). New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. *Journal of Proteomics*, 200: 90–101.
- Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A., y Berger, A. (1973). Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom. *Journal of Lipid Research*, 14(3): 267-278.

- Silva-Carvalho, R., Gaspar, M. Z., Quadros, L. H. B., Lobo, L. G. G., Giuffrida, R., Santarém, C. L., Silva, E. O., Gerez, J. R., Silva, N. J., Hyslop, S., Lomonte, B., & Floriano, R. S. (2022). Partial efficacy of a Brazilian coral snake antivenom and varespladib in neutralizing distinct toxic effects induced by sublethal *Micrurus dumerilii carinicauda* envenoming in rats. *Toxicon*, 213: 99-104.
- Slowinski, J. B. (1995). A Phylogenetic Analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. *Journal of Herpetology*, 29(3): 325-338.
- Strickland, J. L., Smith, C. F., Mason, A. J., Schield, D. R., Borja, M., Castañeda-Gaytán, G., Spencer, C. L., Smith, L. L., Trápaga, A., Bouzid, N. M., Campillo-García, G., Flores-Villela, O. A., Antonio-Rangel, D., Mackessy, S. P., Castoe, T. A., Rokyta, D. R. y Parkinson, C. L. (2018). Evidence for divergent patterns of local selection driving venom variation in Mojave Rattlesnakes (*Crotalus scutulatus*). *Sci rep* 8: 17622.
- Sunagar, K., Jackson, T. N. W., Reeks, T. y Fry, B. G. (2015). Group I Phospholipase A₂ Enzymes. En B.G. Fry (Ed.), *Venomous Reptiles: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery* (pp. 327-334). New York, U. S. A: Oxford University Press.
- Terra, A. L. C., Moreira-Dill, L. S., Simões-Silva, R., Monteiro, J. R. N., Cavalcante, W. L. G., Gallacci, M., Barros, N. B., Nicolete, R., Teles, C. B. G., Medeiros, P. S. M., Zanchi, F. B., Zuliani, J. P., Calderon, L. A., Stábeli, R. G., & Soares, A. M. (2015). Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A₂. *Toxicon*, 103: 1-11.
- Uetz, P., Freed, P. y Hošek, J. (eds.). (2023). *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org>, consultado 05/02/2024.
- Uetz, P., Freed, P. y Hošek, J. (eds.). (2023). *The Reptile Database*, How many species? <http://www.reptile-database.org>, consultado 05/02/2024.
- Utkin, Y., Sunagar, K., Jackson, T. N. W., Reeks, T. y Fry, B. G. (2015). Three-Finger Toxins (3FTxs). En B. G. Fry (Ed.), *Venomous Reptiles: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery* (pp. 215-227). New York, U. S. A: Oxford University Press.

- Valencia-Herverth, J., Fernández-Badillo, L. y Vargas-Licona, G. (2016). Other Contributions. Nature notes. *Micrurus diastema*. Arboreal behavior. Mesoamerican Herpetology, 3(2): 501-502.
- Vargas, M., Sánchez, M., Hernández, A., Gómez, A., Arguedas, M., Sánchez, A., Sánchez, L., Villalta, M., Herrera, M. y Segura, A. (2021). Current Industrial Production of Snake Antivenoms. En S. P. Mackessy (Ed), Handbook of venoms and toxins of reptiles, Second Edition (pp. 485-498). Boca Raton, U. S. A.: *CRC Press Taylor & Francis Group*.
- Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C. V. F., Possani, L. D. y Alagón A. (2014). Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A₂. *J Prot*, 105: 295-306.
- Vitt, L. J. y Caldwell, J. P. (2014). Herpetology, an introductory biology of amphibians and reptiles, 4th edition. Academic Press, Elsevier, San Diego California, U.S.A.
- Waidyanatha, S., Silva, A., Siribaddana, S. e Isbister, G. K. (2019). Long-Term Effects of Snake Envenoming. *Toxins*, 11, 193.
- Wallach, V., Williams, K. L. y Boundy, J. (2014). Snakes of the World: A catalogue of living and extinct species. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- World Health Organization (WHO). (2017). Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report. No. 1004. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization (WHO). (2019). Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yañez-Mendoza, M. F. (2024). Caracterización funcional del veneno de la serpiente de coral mexicana *Micrurus diastema*: evaluación de componentes relevantes en la neurotoxicidad. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Yang, D. C., Dobson, J., Cochran, C., Dashevsky, D., Arbuckle, K., Bénard-Valle, M., Boyer, L., Alagón, A., Hendriks, I., Hodgson, W. C. y Fry, B. G. (2017). The Bold and the Beautiful: a Neurotoxicity Comparison of New World Coral Snakes in the *Micruroides*

and *Micrurus* Genera and Relative Neutralization by Antivenom. *Neurotox Res*, DOI: 10.1007/s12640-017-9771-4.

- Zheng, Y. y Wiens, J.J. (2016). Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94: 537-547.

10. ANEXOS

10.1. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA)

Se utilizó el paquete comercial “BCA Protein Assay Kit” de la marca Pierce™.

Materiales:

-Reactivo A: Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.01 M de hidróxido de sodio.

-Reactivo B: 40% de sulfato cúprico.

-Albúmina sérica bovina (BSA): solución stock a 2 mg/ml en 0.9% NaCl y 0.05% azida de sodio.

-Lector de E.L.I.S.A. con filtro de 570 nm (marca: Magellan).

-Microplacas para E.L.I.S.A. de 96 pozos marca Falcon (sin tratamiento para unir proteínas).

Procedimiento:

1. Preparar las siguientes concentraciones de BSA en PBS a partir del stock 2 mg/ml para realizar la curva estándar.

- 1) 320 µg/ml
- 2) 160 µg/ml
- 3) 80 µg/ml
- 4) 40 µg/ml
- 5) 20 µg/ml

2. Preparar mezcla de reacción (MR) añadiendo 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B.
3. Añadir 200 µl de MR por pozo y mezclar en las microplacas de E.L.I.S.A.
4. Agregar 25 µl de cada ST y MP. Incluir dos pozos con el amortiguador en que se encuentran diluidas las muestras y los estándares.
5. Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37 °C durante dos horas.
6. Leer absorbancia en el lector de E.L.I.S.A. con un filtro de 570 nm.

NOTA: La concentración de la muestra debe estar dentro del rango de la curva estándar, no es confiable realizar extrapolaciones.

10.2. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Fase estacionaria: Columna C18 marca Pursuit[®], modelo xRs-C18, 250 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 µm.

Soluciones de la fase móvil:

- A) Agua destilada (dH₂O) + 0.1% ácido trifluoroacético (TFA).
- B) Acetonitrilo (CH₃CN) + 0.1% TFA.

Flujo de la fase móvil: 1 ml/minuto.

Gradiente utilizado en el fraccionamiento:

Gradiente		
Tiempo (min)	%A	%B
0-5	100	0
5-15	100-90	0-10
15-75	85-55	15-45
75-85	55-30	45-70
85-94	30	70

Las lecturas fueron efectuadas a 214 y 280 nm.

10.3. Ensayo titulométrico de actividad PLA₂

1. Preparación de la solución de yema de huevo al 10%.

a) solución estándar (150 ml)

	[] STOCK	[] TRABAJO	VOL. PARA AÑADIR
NaCl	5 M	0.1 M	3 mL
CaCl ₂	0.1 M	0.01 M	15 mL
Triton X 100	20%	0.5%	3.75 mL

b) Pesar yema de huevo (sin membrana) y aforar con solución estándar hasta 10% p/v (ej. 14 gr-140 ml).

c) Agitar durante 10 minutos.

d) Centrifugar a 380 g durante 5 min. y recuperar el sobrenadante.

2. En 500 µl de solución de yema de huevo al 10% mantener una agitación constante bajo ligero burbujeo de Nitrógeno.

3. Llevar la solución a un pH de 8.05 con NaOH 50 mM.

4. Agregar 1 µl de veneno [1 mg/ml]. *

5. Cuando el pH llegue a 7.99 agregar un vol. De NaOH 50 mM (entre 1 y 5 µl) suficiente para recuperar el pH superior a 8.0.

6. Medir el tiempo transcurrido desde la adición de NaOH hasta que el pH vuelva a bajar a 7.99.

7. Repetir hasta obtener 5 mediciones.

8. Hacer el procedimiento por triplicado.

9. Obtener la pendiente, resultante de graficar la cantidad (µmol) de NaOH en función del tiempo (min).

10. La pendiente ($m = \Delta y / \Delta x$) representa la cantidad de NaOH consumida por minuto. La actividad del veneno se reporta en unidades que se definen como µmol de NaOH consumidas por minuto ($m = U$).

11. Sacar promedio de las tres pendientes y calcular la Actividad Específica, definida como Unidades por mg de veneno.

*La concentración de veneno puede modificarse con el fin de que el ensayo tenga un comportamiento lineal.

10.4. Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

1ª Etapa (Sensibilizado): Los pozos de la placa son llenados con 100 µl de una solución con veneno o toxina a una concentración de 5 µg/ml, en buffer de sensibilizado (100 mM Carbonato-Bicarbonato pH 9.5), es decir, 500 ng de veneno o toxina/pozo (columnas 1 a 11). La última columna de la placa (columna 12) es usada como blanco, por lo que sólo se coloca buffer de sensibilizado. Finalmente, la placa se incuba a 37 °C durante 1h.

*Las placas se lavan por triplicado con 200 µl de buffer de lavado (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 0.05% Tween 20).

2ª Etapa (Bloqueo): Con la finalidad de bloquear los espacios sobre la superficie de la placa a los cuales no se hubiesen pegado componentes del veneno, cada uno de los pozos se llena con 200 µl de solución de bloqueo (0.5% de gelatina y 0.2% Tween 20 en 50 mM Tris/HCl pH 8.0). Posteriormente, la placa es incubada a 37 °C durante 2 h.

*Las placas se lavan por triplicado con 200 µl de buffer de lavado.

3ª Etapa (Incubación con Coralmyn®): En la primera columna de cada placa, se colocan (por triplicado) 150 µl de antiveneno con una concentración de 500 µg/ml en solución de reacción (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mg de gelatina/ml y 0.05% Tween 20). Los pozos restantes son llenados con 100 µl de solución de reacción (columnas 2 a 12), posteriormente se hacen diluciones seriadas en una relación 1:3. Para ello, se toman 50 µl de la columna 1 y se pasan a la columna 2, se mezclan brevemente y se repite el proceso hasta la columna 12, los 50 µl restantes son descartados. La placa es incubada a 37 °C por 1 h.

*Las placas se lavan por triplicado con 200 µl de buffer de lavado.

4ª Etapa (Anticuerpo secundario): Se emplea un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal de color al degradar un sustrato, en este caso se utilizó el anticuerpo comercial *Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-horse IgG* marca KPL, en una dilución 1:3000 en solución de reacción, agregando 100 µl/pozo. La placa es incubada a 37 °C por 1 h.

*Las placas se lavan por triplicado con 200 µl de buffer de lavado.

5ª Etapa (Revelado): En cada pozo se agregan 100 µl de solución/buffer de revelado (ABTS 0.5 mg/ml, buffer citrato-fosfato 70 mM, pH 4.2), a la cual se le añaden 5 µl de

H₂O₂ al 3%. La placa es incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Concluidos los 10 min la reacción es detenida con 30 µl de SDS 10%. La absorbancia es medida a 405 nm en un lector de microplacas, en este caso de la marca TECAN, modelo SUNRISE y los datos se analizaron en el programa Magellan versión 4.3 (Tecan, Männedorf, Suiza).

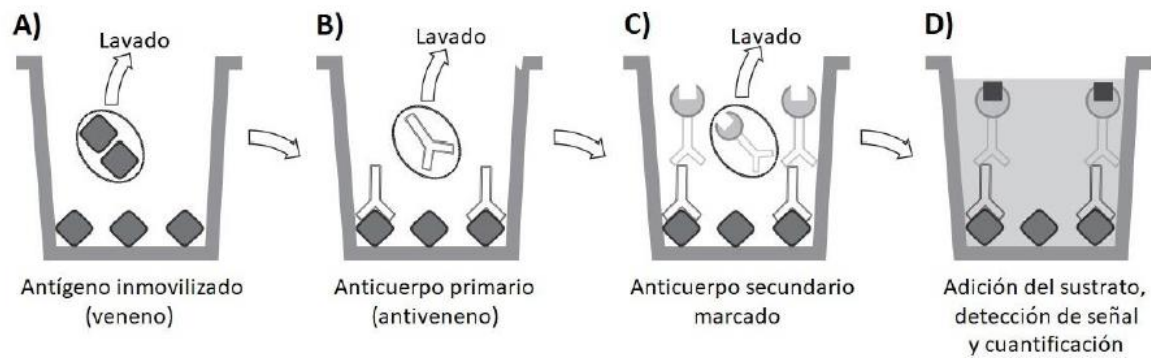


Figura. Elisa indirecto esquematizado. Tomado de Kohl y Ascoli, (2017), modificado por Guadarrama-Martínez, 2023.